

# Charakterisierung Renin-produzierender Zellen in der Aldosteronsynthese- defizienten Maus



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES  
DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)  
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

*vorgelegt von*  
Christian Karger

*aus*  
Regensburg

*im Jahr*  
2014

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von Juli 2010 bis Juni 2014 am Institut für Physiologie der Universität Regensburg.

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am:

24.06.2014

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Prof. Dr. Armin Kurtz

Prüfungskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Richard Warth

Erstgutachter: Prof. Dr. Armin Kurtz

Zweitgutachter: Prof. Dr. Frank Schweda

Drittprüfer: Prof. Dr. Will Minuth

Ersatzprüfer: PD Dr. Rudolf Fuchshofer

Unterschrift:

---

# Inhalt

1. Einleitung .....	7
1.1 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System .....	8
1.2 Renin-Synthese und -Sekretion .....	9
1.3 Regulation der Renin-Synthese und -Sekretion .....	10
1.3.1 Blutdruck .....	11
1.3.2 Salzhaushalt .....	11
1.3.3 Sympathisches Nervensystem .....	12
1.3.4 Angiotensin II .....	12
1.3.5 Aldosteron .....	13
1.3.6 Lokal wirkende Substanzen .....	15
1.4 Zelluläre Regulation der Renin-Synthese und -Sekretion .....	16
1.4.1 cAMP .....	16
1.4.2 Kalzium .....	17
1.4.3 cGMP .....	17
1.5 Renin-produzierende Zellen der Niere .....	18
1.5.1 Renin-produzierende Zellen während der Nierenentwicklung .....	19
1.5.2 Die juxtaglomeruläre Zelle .....	20
1.5.3 Weitere Renin-produzierende Zellen der Niere .....	23
1.6 Connexine im juxtaglomerulären Bereich .....	26
1.7 Zielsetzung .....	31
2. Material und Methoden .....	33
2.1 Material .....	34
2.1.1 Geräte .....	34
2.1.2 Verbrauchsmaterial .....	36
2.1.3 Chemikalien, Enzyme und Kits .....	37
2.1.4 Puffer und Lösungen .....	39
2.1.5 Primer .....	40
2.1.6 Antikörper .....	41
2.1.7 Software und Internetdienste .....	41
2.2 Methoden .....	42
2.2.1 Versuchstiere .....	42
2.2.1.1 Generierung der Mauslinien .....	42
2.2.1.2 Genotypisierung der Mauslinien .....	42
2.2.1.2.1 Gewinnung genomischer DNA .....	42
2.2.1.2.2 PCR-Analyse genomischer DNA .....	43

2.2.1.3	Haltung der Versuchstiere .....	44
2.2.2.	Histologische Methoden.....	44
2.2.2.1	Perfusions-Fixierung der Nieren.....	44
2.2.2.1.1	Retrograde arterielle Perfusions-Fixierung .....	45
2.2.2.1.2	Perfusions-Fixierung über linken Herzventrikel .....	45
2.2.2.2	Einbettung fixierter Nieren in Paraffin .....	46
2.2.2.3	Anfertigung von Paraffinschnitten .....	46
2.2.2.4	Immunhistochemische Färbung.....	47
2.2.3.	Mikroskopie .....	48
2.2.3.1	Lichtmikroskopie.....	48
2.2.3.2	Konfokale Mikroskopie .....	49
2.2.3.3	Transmissionselektronenmikroskopie.....	49
2.2.4.	Molekularbiologische Methoden .....	50
2.2.4.1	Isolierung renaler RNA.....	50
2.2.4.2	RNA-Quantifizierung .....	51
2.2.4.3	cDNA-Synthese.....	51
2.2.4.4	Quantitative Echtzeit-PCR.....	52
2.2.4.5	Bestimmung der Plasma-Renin-Konzentration .....	52
2.2.5.	Isoliert perfundierte Niere.....	53
2.2.6	Blutdruckmessung.....	54
2.2.7	Statistik.....	54
3.	Ergebnisse .....	55
3.1	Charakterisierung Renin-produzierender Zellen der AS <sup>-/-</sup> -Maus.....	56
3.1.1	Lokalisation und Morphologie.....	56
3.1.1.1	Lokalisation.....	56
3.1.1.2	Morphologie .....	58
3.1.1.3	Altersabhängige Veränderungen.....	60
3.1.1.3.1	Veränderungen der Reninzell-Anzahl.....	60
3.1.1.3.2	Totale Renin-mRNA-Abundanz .....	63
3.1.1.3.3	Proliferation perivaskulärer Reninzellen .....	64
3.1.1.4	Zusammenfassung .....	66
3.1.2	Charakterisierung Renin-produzierender Zellen in AS <sup>-/-</sup> -Mäusen durch Nachweis von Zellmarker-Proteinen .....	66
3.1.2.1	Glattmuskelaktin.....	67
3.1.2.2	Sm22 .....	69
3.1.2.3	PDGF-Rezeptor-β.....	70
3.1.2.4	NG2 .....	72



3.1.2.5	Kollagen I .....	73
3.1.2.6	Prokollagen I .....	74
3.1.2.7	Connexin 40 .....	76
3.1.2.8	Aldoketoreduktase 1B7.....	78
3.1.2.9	Zusammenfassung.....	79
3.1.3	Funktionalität.....	80
3.1.3.1	Plasma-Renin-Konzentration .....	80
3.1.3.2	Regulation der Renin-Sekretion am Modell der isoliert perfundierten Niere.....	81
3.1.3.3	Blutdruck.....	86
3.1.3.4	Zusammenfassung.....	86
3.2	Charakterisierung Renin-produzierender Zellen in der AS <sup>-/-</sup> Cx40 <sup>-/-</sup> -Maus .....	87
3.2.1	Lokalisation und Morphologie.....	87
3.2.1.1	Lokalisation.....	87
3.2.1.2	Morphologie .....	89
3.2.1.3	Altersabhängige Veränderungen.....	91
3.2.1.3.1	Veränderungen der Reninzell-Anzahl.....	91
3.2.1.3.2	Unterschiede zur AS <sup>-/-</sup> -Maus.....	92
3.2.1.3.3	Totale Renin-mRNA-Abundanz .....	96
3.2.1.4	Zusammenfassung.....	97
3.2.2	Charakterisierung Renin-produzierender Zellen in AS <sup>-/-</sup> Cx40 <sup>-/-</sup> -Mäusen durch Nachweis von Zellmarker-Proteinen .....	98
3.2.2.1	Glattmuskelaktin.....	98
3.2.2.2	Sm22 .....	98
3.2.2.3	PDGF-Rezeptor-β.....	99
3.2.2.4	NG2 .....	100
3.2.2.5	Kollagen I.....	100
3.2.2.6	Prokollagen I .....	101
3.2.2.7	Connexin 40 .....	102
3.2.2.8	Charakterisierung Renin-armer perivaskulärer Zellen.....	102
3.2.2.9	Zusammenfassung.....	104
3.2.3	Funktionalität.....	104
3.2.3.1	Plasma-Renin-Konzentration .....	104
3.2.3.2	Regulation der Renin-Sekretion am Modell der isoliert perfundierten Niere.....	105
3.2.3.3	Blutdruck.....	107
3.2.3.4	Zusammenfassung.....	108

4. Diskussion .....	109
4.1    Lokalisation und Morphologie Renin-produzierender Zellen in der AS <sup>-/-</sup> -Maus	110
4.2    Charakterisierung Renin-produzierender Zellen der AS <sup>-/-</sup> -Maus anhand von Zellmarker-Proteinen.....	114
4.3    Funktionalität perivaskulärer Reninzellen in AS <sup>-/-</sup> - Mäusen.....	118
4.4    Relevanz von Cx40 für perivaskuläre Renin-bildende Zellen .....	122
5. Zusammenfassung .....	128
6. Literaturverzeichnis .....	132
7. Anhang.....	154
7.1    Abbildungsverzeichnis .....	155
7.2    Tabellenverzeichnis.....	158
7.3    Abkürzungsverzeichnis.....	159
7.3    Veröffentlichungen .....	161
7.4    Danksagung.....	162
7.5    Erklärung.....	163

# 1. Einleitung

## 1.1 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) steuert über das Zusammenspiel verschiedener Hormone den Salz- und Wasserhaushalt des Körpers und wirkt dadurch regulierend auf den Blutdruck (s. Abb. 1.1). Die aus den juxtaglomerulären Zellen der Niere ins Blut freigesetzte Aspartyl-Protease Renin spaltet zunächst von dem in der Leber gebildeten Oligopeptid Angiotensinogen das biologisch inaktive Dekapeptid Angiotensin I ab. Dieses wird von *angiotensin converting enzyme* (ACE), welches in der Lunge hergestellt wird, in das Oktapeptid Angiotensin II umgewandelt. Angiotensin II ist das eigentliche Effektorhormon der RAAS-Kaskade.

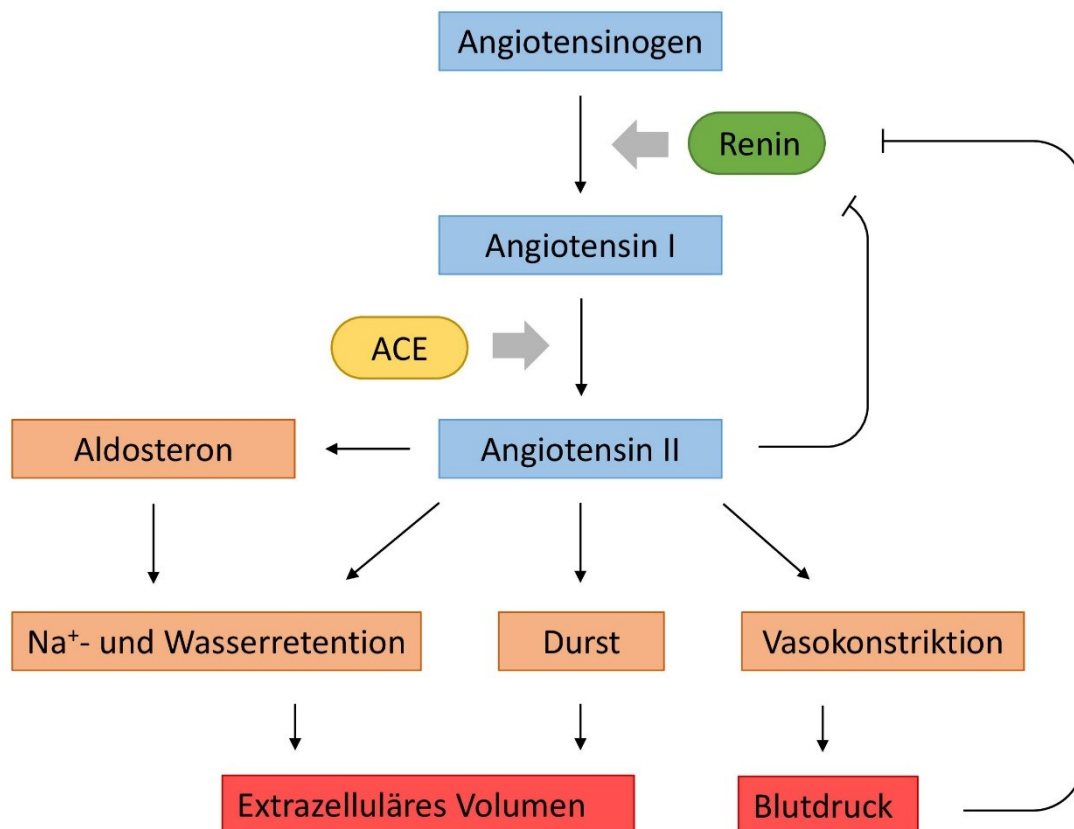


Abb. 1.1: Schematische Darstellung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems. (Erklärung s. Text)

Angiotensin II ist ein vasokonstriktorisches Hormon und verursacht durch eine Verengung der Blutgefäße einen Anstieg des Blutdrucks. Zudem bewirkt es verstärktes Durstgefühl und stimuliert in der Nebennierenrinde die Synthese und Ausschüttung des Steroidhormons Aldosteron. Dieses fördert in der Niere den

Rücktransport von Kochsalz und Wasser aus dem Urin zurück ins Blut, was zu einer Erhöhung des Blutvolumens und damit des Blutdrucks führt (Hackenthal *et al.*, 1990).

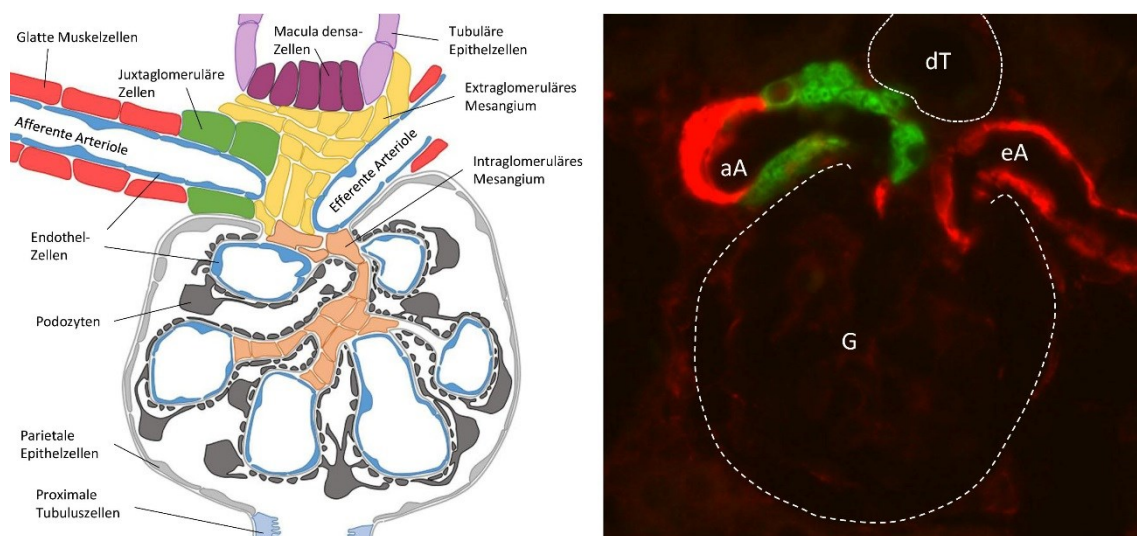
Den limitierenden Faktor für die Synthese von Angiotensin II stellt die Konzentration von Renin dar (Kurtz, 1989; Mercure *et al.*, 1998 Peters und Clausmeyer, 2002). Zur Selbstregulierung des RAAS wirken ein erhöhter Blutdruck sowie Angiotensin II selbst, über negative Rückkopplungs-Mechanismen hemmend auf die Freisetzung von Renin (Hackenthal *et al.*, 1990).

## 1.2 Renin-Synthese und -Sekretion

Die Aspartyl-Protease Renin stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Faktor der RAAS-Kaskade dar. In der Niere erfolgt die Synthese von Renin in den juxtaglomerulären Epitheloidzellen. Hier findet die Transkription des auf Chromosom 1 gelegenen *Ren1c*-Gens statt. Im Gegensatz zu anderen Säugetierarten besitzen manche Mäusestämme zwei verschiedene Renin-Gene, *Ren1d* und *Ren2*, die evolutionär vermutlich aus einer Genduplikation entstanden sind. Das *Ren2*-Genprodukt besitzt allerdings keine Glykosylierungsstellen. Es wird daher konstitutiv freigesetzt und kann im Gegensatz zum *Ren1d* und *Ren1c*-Genprodukt nicht über regulierte Exozytose sezerniert werden (Morris, 1992; Mullins *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2009).

Renin wird in den juxtaglomerulären Zellen (s. Abb. 1.2) zunächst als Präprorenin translatiert, welches direkt in das endoplasmatische Retikulum transferiert wird. Durch Abspaltung der Prä-Sequenz, welche das Signalpeptid für die Translokation ins endoplasmatische Retikulum darstellt, entsteht das enzymatisch inaktive Prorenin (Hackenthal *et al.*, 1990; Morris *et al.*, 1992 und 1996; Tamura *et al.*, 1995). Dieses wird in den Golgi-Apparat weitertransportiert und entweder konstitutiv sezerniert oder durch Anhängen eines Mannose-6-Phosphatrestes glykosyliert (Faust *et al.*, 1987; Chao *et al.*, 1990) und anschließend in Lysosomen-ähnliche Vesikel, die Speichergranula oder Protogranula verpackt (Taugner *et al.*, 1987; Chao *et al.*, 1990). In diesen Vesikeln erfolgt die Umwandlung von inaktivem Prorenin in aktives Renin. Dies geschieht durch Abspaltung der 46 Aminosäuren langen N-terminalen Pro-Sequenz mit Hilfe von Proteasen, wobei der genaue

Prozess hinter dieser Reaktion noch nicht beschrieben ist. Diskutiert wird die Beteiligung von Cathepsin B (Hackenthal *et al.*, 1990; Neves *et al.*, 1996; Jutras *et al.*, 1999) oder Prohormon-Konvertasen (Buhrle *et al.*, 1984; Laframboise *et al.*, 1997), die sich zusammen mit Prorenin in den Vesikeln finden lassen. Die Vesikel selbst weisen einen sauren pH-Wert (pH 4-6) auf, wodurch eine optimale Protease-Aktivität gewährleistet ist (Alund *et al.*, 1980, Kim *et al.*, 2007). Das fertig prozessierte aktive Renin kann dann bei Bedarf über eine regulierte Exozytose aus den Speichervesikeln freigesetzt werden. Trotz einer Vielzahl an Renin-beinhaltenenden Vesikeln finden in der Zelle nur wenige Exozytose-Vorgänge statt, deren freigesetztes Renin den physiologischen Bedarf im Kreislauf decken kann (Taugner *et al.*, 1987). Auch aufgrund der Seltenheit der Exozytosevorgänge sind die genauen Mechanismen, die diesen Vorgang steuern, bisher noch nicht ausreichend beschrieben (Rasch *et al.*, 1998; Peti-Peterdi *et al.*, 2004; Schweda *et al.*, 2007).



**Abb. 1.2:** Links: Schematische Darstellung eines Glomerulus. Rechts: Immunhistochemische Aufnahme eines Glomerulus (G) mit afferenter (aA) und efferenter Arteriole (eA) sowie distalem Tubulus (dT). Grün: Renin (juxtaglomeruläre Zellen); Rot: Glattmuskelaktin (glatte Muskelzellen);

### 1.3 Regulation der Renin-Synthese und -Sekretion

Als Schlüssel-Enzym des RAAS unterliegt die Synthese und Sekretion von Renin einer starken Kontrolle. So ist gewährleistet, dass der Körper auf Blutdruckänderungen und Störungen des Salz- und Wasserhaushalts adäquat

reagieren kann. Die Steuerung der Renin-Synthese und -Sekretion erfolgt nicht durch einen einzigen, sondern durch mehrere voneinander unabhängige Faktoren (Castrop *et al.*, 2010).

### 1.3.1 Blutdruck

Der Blutdruck ist ein zentraler Regulator der Aktivität des RAAS. Ein erniedrigter systemischer Blutdruck führt auch in der Niere zu einem Abfall des renalen Perfusionsdrucks. Dieser wird in der Niere registriert und führt hier zu einer vermehrten Produktion und Ausschüttung von Renin. Über die Aktivität und Wirkung der Effektor-Hormone der RAAS-Kaskade wird im Folgenden dem Blutdruckabfall entgegengewirkt. Ein erhöhter renaler Perfusionsdruck hemmt dagegen die Freisetzung von Renin aus den juxtaglomerulären Zellen (Davis und Freeman, 1976; Nafz *et al.*, 1997). Der drucksensitive Rezeptor, der diese Mechanismen steuert, scheint in der Niere selbst zu liegen, da die Kontrolle der Renin-Sekretion auch in isoliert perfundierten Nieren zu finden ist (Scholz *et al.*, 1994). Man spricht deshalb auch vom renalen Barorezeptor. Welche zelluläre Komponente hinter diesem Rezeptor steckt und wo diese in der Niere zu finden ist, ist bisher allerdings nicht bekannt. Diskutiert wird, dass der intraluminale Druck die Wandspannung der Gefäße verändert und Mechanorezeptoren in den juxtaglomerulären Zellen so die Änderungen des renalen Perfusionsdrucks registrieren (Fray und Lush, 1976; Carey *et al.*, 1997; Ryan *et al.*, 2000).

### 1.3.2 Salzhaushalt

Die Aktivität des RAAS ist abhängig von der Kochsalzaufnahme des Körpers. Kochsalzarme Ernährung aktiviert die Synthese und Sekretion von Renin, während die Aufnahme kochsalzreicher Nahrung einen inhibierenden Effekt zeigt (Wagner und Kurtz, 1998). Die salzabhängige Regulation des RAAS wird vermutlich über die *Macula densa*-Zellen gesteuert (Goormaghtigh, 1937; Vander, 1967). Dies sind spezialisierte Epithelzellen des distalen Tubulus, die in direktem Kontakt mit der afferenten Arteriole des jeweiligen Nephrons stehen (s. Abb. 1.2). Die *Macula densa*-Zellen reagieren auf Veränderungen der NaCl-Konzentration im Lumen des distalen Tubulus und leiten ein Signal an die Renin-produzierenden Zellen der

afferenten Arteriole weiter. Dies geschieht möglicherweise über NO oder Prostaglandine, die in *Macula densa*-Zellen durch Cyclooxygenase-2 und NO-Synthase I hergestellt werden (Mundel *et al.*, 1992; Harris *et al.*, 1994; Peti-Peterdi und Harris, 2010). Neuere Befunde zeigen allerdings, dass dem *Macula densa*-Signal keine allein regulierende, sondern eher eine modulierende Funktion bei der Steuerung der Aktivität des RAAS zuzuschreiben ist (Castrop *et al.*, 2004). Zudem scheint die *Macula densa*-abhängige Kontrolle der Renin-Sekretion hauptsächlich auf akute und weniger auf chronische Veränderungen der tubulären NaCl-Konzentration zu reagieren (Castrop *et al.*, 2010). Bei der Bewertung des Einflusses der NaCl-Konzentration auf die Aktivität des RAAS, ist zudem zu beachten, dass eine veränderte Salzaufnahme auch zu einem veränderten Blutdruck führen kann (O'Shaughnessy und Karet, 2004), der seinerseits regulierend auf das RAAS wirkt.

### 1.3.3 Sympathisches Nervensystem

Es wurde gezeigt, dass das sympathische Nervensystem Synthese und Sekretion von Renin über die Aktivierung von  $\beta$ 1-adrenergen Rezeptoren beeinflusst. Diese finden sich in der Niere auf den Renin-produzierenden juxtaglomerulären Zellen (Hackenthal *et al.*, 1990; Boivin *et al.*, 2001). Aus sympathischen Nervenenden freigesetzte Katecholamine binden an  $\beta$ 1-Adrenozeptoren der juxtaglomerulären Zellen, was zu einer Aktivierung des  $G_s$ -Proteins führt. Dieses vermittelt die Aktivierung von Adenylzyklasen und damit einen intrazellulären Anstieg von cAMP, was in der Zelle letztendlich zu verstärkter Renin-Expression und -Sekretion führt (Holmer *et al.*, 1997; Kurtz, 1997; Schweda und Kurtz, 2004)

### 1.3.4 Angiotensin II

Ausschüttung von Renin führt über die RAAS-Enzymkaskade zu einer vermehrten Bildung von Angiotensin II. Dieses besitzt einen vasokonstriktorischen Effekt und stimuliert die verstärkte Freisetzung von Aldosteron aus der Nebennierenrinde. Zudem zeigt Angiotensin II einen inhibierenden Effekt auf Synthese und Sekretion von Renin im Sinne einer negativen Rückkopplungs-Kontrolle (Hackenthal *et al.*, 1990; Kurtz und Wagner, 1999). Dieser Effekt wird über AT1-Rezeptoren



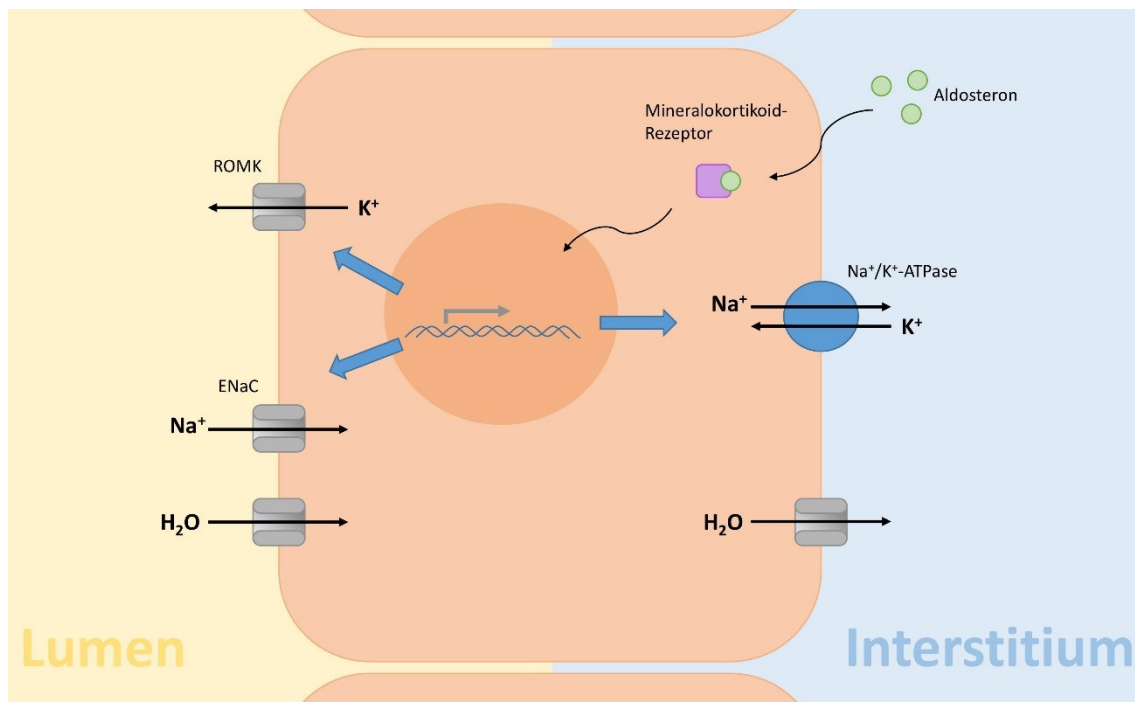
vermittelt, die an der Oberfläche von Renin-produzierenden Zellen zu finden sind (Höcherl *et al.*, 2001). Angiotensin II bindet an diese Rezeptoren, was in der Zelle zu einer Aktivierung der Phospholipase C führt. Diese wiederum bewirkt eine Aktivierung der Proteinkinase C und einen Anstieg der intrazellulären Kalzium-Konzentration in der Zelle. Die hohen Kalzium-Konzentrationen wirken inhibierend auf Renin-Synthese und Sekretion (Kurtz und Penner, 1989).

### 1.3.5 Aldosteron

Das Steroidhormon Aldosteron stellt wie Angiotensin II ein Effektor-Hormon des RAAS dar. Ähnlich wie im Fall von Angiotensin II stehen auch Aldosteron und Renin über einen negativen Rückkopplungs-Mechanismus in Verbindung.

Aldosteron wird von spezialisierten Zellen innerhalb der *Zona glomerulosa*, der äußersten Schicht der Nebennierenrinde, gebildet. Die Produktion wird insbesondere durch Angiotensin II stimuliert. Zudem wirken Natrium-Mangel und eine erhöhte Kalium-Konzentration stimulierend auf die Aldosteron-Sekretion. Auch das Peptid-Hormon Adrenocorticotropin (ACTH) regt die Freisetzung von Aldosteron an, während atriales natriuretisches Peptid (ANP) hemmend wirkt. Die Biosynthese von Aldosteron erfolgt in einem mehrstufigen Prozess durch Umwandlung von Cholesterin, wobei die letzten Schritte, die zur Bildung von Aldosteron führen, durch das Enzym Aldosteronsynthase katalysiert werden. Dies sind die Umwandlung von 11-Deoxycorticosteron zu Corticosteron, die Umwandlung von Corticosteron zu 18 OH-Corticosteron und die abschließende Oxidation von 18 OH-Corticosteron, die Aldosteron ergibt. Aldosteron ist direkt an der Aufrechterhaltung bzw. Wiederherstellung des Wasser- und Elektrolythaushalts beteiligt. Zu diesem Zweck ist Aldosteron in der Lage, den Elektrolyttransport, genauer gesagt den Transport von Natrium und Kalium im Nephron zu beeinflussen. Freigesetztes Aldosteron bewirkt in den Verbindungstübuli und Sammelrohren der Niere einen vermehrten Einbau von Natrium- (ENaC) und Kaliumkanälen (ROMK) sowie der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. Die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase erzeugt den elektrochemischen Gradienten, der die Triebkraft für die Aufnahme von Natrium und die Sekretion von Kalium darstellt. Der vermehrte Transport von Natrium aus dem tubulären Lumen über das Epithel hat auch eine

vermehrte Wasserrückresorption zur Folge, die zu einem Anstieg des Blutvolumens und damit des Blutdrucks führt. Der Effekt von Aldosteron wird über Aktivierung des intrazellulären Mineralokortikoid-Rezeptors (MR) vermittelt. Das membrangängige Aldosteron bindet an diesen Rezeptor und bildet mit diesem einen Komplex, welcher in den Zellkern transloziert und hier als Transkriptionsfaktor fungiert. Über Bindung an *steroid response elements* (SRE) kann so die Expression von Genen reguliert werden (s. Abb. 1.3).



**Abb. 1.3:** Aktivierung des Mineralokortikoid-Rezeptors (MR) führt zu vermehrter Natrium- und Wasserrückresorption über das Sammelrohr-Epithel. Membrängängiges Aldosteron bildet mit MR einen Komplex, der in den Zellkern der Epithelzellen wandert und hier als Transkriptionsfaktor fungiert. Stimulierung der Expression verschiedener Gene hat den vermehrten Einbau von Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase sowie von Natrium- und Kalium-Kanälen zur Folge.

MR-defiziente Mäuse zeigen eine starke Hyponatriämie und Hyperkaliämie sowie ein aktiviertes Renin-Angiotensin-System (Berger *et al.*, 1998). Neben dem Mineralokortikoid-Rezeptor ist Aldosteron auch in der Lage, an Glukokortikoid-Rezeptoren zu binden. Umgekehrt aktivieren Glukokortikoide auch den Mineralokortikoid-Rezeptor. Da beide Rezeptoren unterschiedliche Funktionen besitzen (Cole *et al.*, 1995; Berger *et al.*, 1998), wird eine Cross-Reaktion zwischen Aldosteron und Glukokortikoiden durch Unterschiede in der Lokalisation und Konzentration der Liganden verhindert. Zudem können störende Glukokortikoide durch 11-Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 2 inaktiviert werden (Farman und

Bocchi, 2000; Stockand, 2002). In den letzten Jahren wurden vermehrt Proteine identifiziert, die in der Lage sind, einen Aldosteron-Effekt zu vermitteln. Zu diesen gehören die Serum- und Glukokortikoid-induzierbaren Kinasen (SgK) oder das monomere Kirsten Ras-GTP-bindende Protein. SgK scheint beispielsweise Proteine zu phosphorylieren, die für den Einbau von ENaC in die Zellmembran bzw. für Entfernung von ENaC aus der Zellmembran zuständig sind (Snyder *et al.*, 2002; Stockand 2002). Kirsten Ras-GTP-bindende Proteine wirken vermutlich über Aktivierung der Mitogen-aktivierten-Proteinkinase (MAPK)-Kaskade (Spindler *et al.*, 1997). Klar *et al.* (2004) konnten an Renin-produzierenden Zellen zeigen, dass diese den Mineralokortikoid-Rezeptor exprimieren und dass Aldosteron einen positiven Effekt auf die Renin-Genexpression zeigt, der möglicherweise über eine Stabilisierung der Renin-mRNA erreicht wird. Im Gegensatz dazu zeigten MR- und Aldosteronsynthase-defiziente Mäuse trotz des unterbrochenen Aldosteron-Signalwegs stark erhöhte Reninwerte. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass es hier durch die fehlende Wirkung von Aldosteron zu einem erniedrigten Blutdruck kommt, der zu einer Stimulation der Renin-Synthese und -Sekretion führt (Berger *et al.*, 2000; Makhanova *et al.*, 2006).

### 1.3.6 Lokal wirkende Substanzen

Neben den oben beschriebenen systemisch wirkenden Faktoren, gibt es noch eine Vielzahl lokal wirkender Substanzen, von denen bekannt ist, dass sie regulierend auf die Renin-Synthese und -Sekretion wirken.

Zu den wichtigsten inhibierenden Substanzen zählen *tumor necrosis factor* TNF $\alpha$ , Interleukin-1 und -6, TGF- $\beta$ II, *platelet activating factor* (PAF), das atriale natriuretische Peptid (ANP), Adenosin, Endothelin und Vasopressin (Petrovic *et al.*, 1997; Keeton und Campell, 1980; Pfeilschifter *et al.*, 1985; Kurtz *et al.*, 1988; Scholz *et al.*, 1995; Pietri *et al.*, 2002; Todorov *et al.*, 2002; Kageyama 1990; Kurtz *et al.*, 1986). Zu den stimulierenden Faktoren des RAAS gehören Adrenomedullin, Bradykinin, *calcitonin gene related peptide* (CGRP), Stickstoffmonoxid, die Prostaglandine PGE2 und PGI2, sowie Histamin, Thyroxin und Triiodthyronin (Keeton und Campell 1980; Kurtz *et al.*, 1988; Jensen *et al.*, 1997 a; Chen *et al.*, 2007 a; Schwertschlag und Hackenthal, 1982).

## 1.4 Zelluläre Regulation der Renin-Synthese und -Sekretion

Nach dem derzeitigen Wissensstand nimmt man an, dass die Renin-Synthese und -Sekretion innerhalb der Zelle durch das Zusammenspiel der drei intrazellulären *second messenger*-Moleküle Kalzium, zyklisches AMP (cAMP) und zyklisches GMP (cGMP) kontrolliert wird (Schweda *et al.*, 2007; Kurtz, 2011).

### 1.4.1 cAMP

Der cAMP-Gehalt der Zelle wird durch das Zusammenspiel von Adenylylzyklasen und Phosphodiesterasen, welche cAMP synthetisieren bzw. abbauen, reguliert. Der cAMP-Signalweg scheint entscheidend für die Vermittlung einer Stimulierung der Renin-Sekretion. Dies folgt aus den Ergebnissen einer Vielzahl von Experimenten, die alle eine Steigerung der intrazellulären cAMP-Konzentration mit einer erhöhten Renin-Sekretion in Verbindung bringen konnten. Beispielsweise führen Hormone, die die Aktivität der Adenylylzyklase steigern, wie Prostaglandin E2 und I2 (Friis *et al.*, 2005; Jensen *et al.*, 1996), Adrenomedullin (Jensen *et al.*, 1997 a), Dopamin (Kurtz *et al.*, 1988 a) und die Neurohormone CGRP (Kurtz *et al.*, 1988 b) und PACAP (Hauptmann *et al.*, 2007) zu einer Erhöhung der Renin-Sekretion. Das gleiche Ergebnis zeigte sich nach Aktivierung der  $\beta$ 1-adrenergen Rezeptoren, die ihrerseits die Adenylylzyklasen aktivieren sowie nach direkter Aktivierung der Adenylylzyklasen durch Forskolin (Kurtz *et al.*, 1984; Hackenthal *et al.*, 1990). Auch eine Inaktivierung von Phosphodiesterasen, die für den Abbau von cAMP verantwortlich sind, durch IBMX (Iso-Butyl-Methyl-Xanthin), führt zu einer erhöhten Sekretion von Renin (Churchill und Churchill, 1982; Yukimura *et al.*, 1986; Della Bruna *et al.*, 1993). Es zeigte sich weiterhin, dass membrangängige cAMP-Analoga in der Lage sind, die Renin-Freisetzung zu stimulieren (Grünberger *et al.*, 2006). Der molekulare Mechanismus über den cAMP Einfluss auf die Renin-Sekretion nimmt, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Vermutet wird eine Aktivierung der Proteinkinase A, deren Zielmoleküle, die letztendlich die Synthese und Sekretion von Renin steuern, aber noch unbekannt sind (Schweda *et al.*, 2007).

### 1.4.2 Kalzium

Wenn man die Rolle von Kalzium bei der Renin-Regulation betrachtet, spricht man auch vom Kalzium-Paradoxon der Renin-Sekretion (Hackenthal *et al.*, 1990). Während eine hohe intrazelluläre Kalzium-Konzentration in einer Vielzahl von anderen sekretorischen Zellen die Exozytose von Speicher-Vesikeln stimuliert (Cohen *et al.*, 1997), wird in den juxtaglomerulären Zellen der Niere die Sekretion von Renin durch Kalzium gehemmt. Hormone wie Angiotensin II und Endothelin, die einen Anstieg der intrazellulären Kalzium-Konzentration bewirken, hemmen daher die Renin-Freisetzung (Kurtz *et al.*, 1986; Ichihara *et al.*, 1995; Takagi *et al.*, 1988; van Dongen und Peart, 1974). Eine Absenkung der extrazellulären Kalzium-Konzentration, die sich auch auf den Kalzium-Spiegel in der Zelle auswirkt, führt dagegen in isolierten Nieren, isolierten Glomeruli und Primär-Kulturen von Renin-produzierenden Zellen zu einem Anstieg der Renin-Sekretion (Scholz *et al.*, 1994; Baumbach *et al.*, 1976; Ortiz-Capisano *et al.*, 2007). Über welche Moleküle der *second messenger* Kalzium regulierend auf die Renin-Sekretion wirken kann, ist bisher noch nicht ausreichend beschrieben. Mögliche Zielmoleküle, die Einfluss auf die Renin-Sekretion nehmen können, sind Kalzium-bindende Moleküle wie Calmodulin und Calcineurin, die Proteinkinase C, Myofilamente oder Kalzium-aktivierte Chlorid-Kanäle (Schricker und Kurtz, 1995; Madsen *et al.*, 2010; Kurtz *et al.*, 1986; Hano *et al.*, 1990; Taugner *et al.*, 1988; Kurtz und Penner, 1989). Diskutiert wird auch ein direkter Einfluss von Kalzium auf die intrazelluläre cAMP-Konzentration über die Adenylylzyklasen AC5 und AC6, die durch Kalzium inhibiert werden können (Grünberger *et al.*, 2006, Ortiz-Capisano *et al.*, 2007). Ein Anstieg der zytosolischen Kalzium-Konzentration könnte also die Adenylylzyklase-Aktivität in Renin-produzierenden Zellen hemmen und so den cAMP-Spiegel, der die Renin-Sekretion stimuliert, herabsetzen.

### 1.4.3 cGMP

Während cAMP einen stimulierenden und Kalzium einen inhibierenden Effekt auf die Renin-Synthese und -Sekretion zeigt, ist die Rolle von cGMP bei der zellulären Renin-Regulation nicht klar definiert (Kurtz, 1989; Reid und Chiu, 1995; Romero *et al.*, 1992). Für cGMP wurde sowohl eine Inhibierung als auch eine Stimulierung der

Renin-Freisetzung nachgewiesen. So führt beispielsweise die hochkonzentrierte Applikation von membrangängigen cGMP-Analoga in verschiedenen Modellen zu einer Unterdrückung der Renin-Sekretion (Kurtz *et al.*, 1986; Heinrich *et al.*, 1988; Noble *et al.*, 1994; Greenberg *et al.*, 1995). Andererseits stimuliert cGMP, das in isolierte juxtaglomeruläre Zellen injiziert wurde, die Exozytose von Renin (Friis *et al.*, 2002). Diese unterschiedlichen Effekte von cGMP beruhen vermutlich darauf, dass cGMP bei unterschiedlichen Konzentrationen verschiedene Zielmoleküle anspricht. Ein Zielmolekül von cGMP ist die Phosphodiesterase PDE-3. PDE-3-Inhibition führt in den Renin-produzierenden Zellen zu einem Anstieg der Renin-Sekretion (Beavo, 1995; Reid und Chiu, 1996; Friis *et al.*, 2002). Da PDE-3 eine hohe Affinität zu cGMP besitzt, wird diese bereits bei niedrigen cGMP-Konzentrationen von cGMP gehemmt, was zu einem Anstieg der cAMP-Level und damit zu einem Anstieg der Renin-Sekretion führt. Ein weiteres Zielmolekül ist die cGMP-abhängige Proteinkinase II (cGKII). Diese findet sich assoziiert mit den Renin-Speichergranula und übt nach Aktivierung durch cGMP einen inhibitorischen Effekt auf die Renin-Freisetzung aus (Kurtz und Wagner, 1998; Gambaryan *et al.*, 1998; Wagner *et al.*, 1998). Da cGKII nur eine geringe Affinität zu cGMP zeigt, wird dieser inhibitorische Effekt erst bei hohen Konzentrationen von cGMP sichtbar.

## 1.5 Renin-produzierende Zellen der Niere

Die Renin-bildenden Zellen des Körpers finden sich nahezu ausschließlich in der Niere. Neben der Niere gibt es allerdings auch noch andere Gewebe, in denen die Produktion und Sekretion von Renin nachgewiesen wurde (Naruse *et al.*, 1985; Deschepper *et al.*, 1986; Itskovitz *et al.*, 1992). So finden sich beispielsweise im Gehirn, Herz und Nebennieren lokale Renin-Angiotensin-Systeme, die unabhängig von der Renin-Produktion der Niere sind (Ganong, 1984; Paul *et al.*, 2006). Systemisch betrachtet, ist der Einfluss der extrarenalen Renin-Quellen allerdings zu vernachlässigen, weshalb auf diese im Folgenden nicht weiter eingegangen wird (Friis *et al.*, 2013).

In der Niere selbst stellen die juxtaglomerulären Zellen die klassischen Renin-produzierenden Zellen dar. Sie sind jedoch nicht das einzige Beispiel für renale

Renin-bildende Zellen. Abhängig vom Entwicklungszustand und der Stimulation des RAAS finden sich in der Niere weitere Renin-produzierende Zellen.

### 1.5.1 Renin-produzierende Zellen während der Nierenentwicklung

Während der Nephrogenese findet sich erstes Renin bereits im undifferenzierten Mesenchym der Urniere (Richoux *et al.*, 1987; Sequeira-Lopez *et al.*, 2001). Man nimmt an, dass die Reninzellen, die in der fertig entwickelten Niere auftreten, von renalen Renin-Vorläuferzellen abstammen, die sich aus FoxD1-positiven Mesenchymzellen des Mesonephros entwickeln (Sequeira-Lopez *et al.*, 2001). FoxD1 ist ein Transkriptionsfaktor, der in Zellen der sich entwickelnden Niere exprimiert wird. Wie die Verfolgung der Zelllinie FoxD1-positiver Zellen zeigte, entwickeln sich aus diesen vermutlich die Renin-produzierenden Zellen der Niere (Humphreys *et al.*, 2010; Sequeira-Lopez und Gomez, 2011). Matsushita *et al.* (2009) zeigten im Zusammenhang mit Renin-Vorläuferzellen, dass es möglich ist, sowohl humane als auch murine mesenchymale Stammzellen in Renin-produzierende Zellen umzuwandeln. In Mäusen und Ratten treten metanephrische Renin-produzierenden Zellen erstmals um den Embryonaltag 14 auf, sobald in der Niere die Vaskularisierung beginnt. Die Reninzellen finden sich hier entlang der Wände der arteriellen Gefäße (Minuth *et al.*, 1981; Richoux *et al.*, 1987; Celio *et al.*, 1985). Mit zunehmender Größe des renalen Gefäßbaums steigt auch die Anzahl der Renin-produzierenden Zellen in der Niere. Das Maximum der Renin-Expression in der Niere wird dabei in den Tagen um die Geburt erreicht (Gomez, 1998; Guron und Friberg, 2000). Im weiteren Verlauf der Nephrogenese sinkt die Reninzell-Anzahl wieder und die Renin-produzierenden Zellen finden sich nicht mehr in den größeren renalen Gefäßen, sondern zeigen sich nur noch im Bereich der sich neu entwickelnden afferenten Arteriolen. In der vollständig entwickelten Niere von adulten Tieren findet sich die Produktion von Renin schließlich nur noch in wenigen Reninzellen an klassischer juxtaglomerulärer Position. Ein ähnlicher Verlauf der Renin-Expression wurde neben Mäusen und Ratten auch in der Nierenentwicklung von anderen Säugetierarten wie Hamstern, Kaninchen, Schafen, Schweinen und Menschen beschrieben (Dodge, 1993; Drukker *et al.*, 1983; Carbone *et al.*, 1993; Kon *et al.*, 1989; Egerer *et al.*, 1984; Phat *et al.*, 1981; Celio *et al.*, 1985; Graham, 1992).



### 1.5.2 Die juxtaglomeruläre Zelle

Die juxtaglomerulären Zellen der afferenten Arteriole sind die typischen Renin-produzierenden Zellen in der adulten Niere (Latta, 1973; Taugner *et al.*, 1979; McGowan *et al.*, 1980; Barajas und Salido, 1986; Deschepper *et al.*, 1986). Sie liegen in der *Tunica media* der afferenten Arteriole und finden sich direkt am Gefäßpol des Glomerulus am Übergang zum glomerulären Kapillargeflecht. Gemeinsam mit den *Macula densa*-Zellen und den extraglomerulären Mesangialzellen bilden sie hier den juxtaglomerulären Apparat (s. Abb. 1.2).

Die juxtaglomerulären Zellen weisen eine kuboide Form auf, die an das Erscheinungsbild von Epithelzellen erinnert. Daher stammt auch der häufig verwendete Name juxtaglomeruläre Epitheloidzellen (Taugner und Hackenthal, 1989). Die durchschnittliche Größe der Zellen in der Maus wird mit etwa  $500\ \mu\text{m}^3$  angegeben (Friis *et al.*, 1999). Dies entspricht einem Würfel mit einer Kantenlänge von ca.  $8\ \mu\text{m}$ . Elektronenmikroskopisch betrachtet, zeichnen sich die Zellen durch eine Vielzahl der charakteristischen Renin-haltigen Vesikel aus. Diese besitzen in Mäusen ein durchschnittliches Volumen von etwa  $0,63\ \mu\text{m}^3$  (Jensen *et al.*, 1997 b). Neben den Renin-Vesikeln zeigen sich in den juxtaglomerulären Zellen außerdem weitere kleinere Vesikel und Peroxisomen. In den größeren, reifen und elektronendichten Vesikeln befindet sich das aktive Renin, während die kleineren weniger dichten Vesikel, die auch als Protogranula bezeichnet werden, hauptsächlich inaktives Prorenin beinhalten (Hunt *et al.*, 1992). Neben den Vesikeln findet sich in den juxtaglomerulären Zellen charakteristischerweise ein vergrößertes rauhes endoplasmatisches Retikulum, ein gut ausgebildeter Golgi-Apparat, Myofilamente sowie wenige Mitochondrien (Taugner und Hackenthal, 1989; Hackenthal *et al.*, 1990). Im Bereich der juxtaglomerulären Zellen konnten zudem die Endigungen adrenerger Nervenfasern nachgewiesen werden (Barajas und Müller, 1973). Nach Barajas (1970) wird etwa die Hälfte der granulierten Zellen des juxtaglomerulären Zellkomplexes nerval versorgt. Es finden sich auch eine große Anzahl von Gap-Junctions, die sowohl die juxtaglomerulären Zellen untereinander verbinden, als auch eine Verbindung zu den benachbarten extraglomerulären Mesangialzellen und zu den Endothelzellen der afferenten Arteriole herstellen. Auf diese Weise entsteht ein funktionelles Synzytium zwischen den Zellen des juxtaglomerulären Apparates (Mink *et al.*, 1984; Taugner



*et al.*, 1984; Taugner *et al.*, 1978). Die juxtaglomerulären Reninzellen sind eng verwandt mit den benachbarten glatten Muskelzellen der afferenten Arteriole. Es wurde bereits vielfach gezeigt, dass die glatten Muskelzellen in der Lage sind, sich im Zuge einer metaplastischen Transformation in Renin-produzierende Zellen umzuwandeln, wenn im Körper das RAAS stimuliert wird (Cantin *et al.*, 1977; Gomez *et al.*, 1990; Sequeira-Lopez *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2007 b). Interessanterweise wird der erhöhte Renin-Bedarf bei stimuliertem RAAS auf diese Weise, d. h. durch eine Erhöhung der Anzahl Renin-produzierender Zellen gedeckt und nicht durch eine vermehrte Sekretion von Renin aus den bereits bestehenden juxtaglomerulären Reninzellen. Dies ist erstaunlich, da in juxtaglomerulären Zellen deutlich mehr aktives Renin gespeichert ist, als unter normalen Umständen benötigt wird (Taugner *et al.*, 1984 a). In Studien wurde berechnet, dass die Exozytose eines einzigen Renin-Vesikels pro afferenter Arteriole in der Minute ausreichen sollte, um den physiologischen Bedarf an Renin im Kreislauf zu decken. Das gespeicherte Renin in den juxtaglomerulären Zellen würde nach dieser Berechnung ausreichen, um eine Maus unter Normalbedingungen für 26 Tage mit Renin zu versorgen (Taugner *et al.*, 1984 a). Friis *et al.* (2013) nehmen an, dass durch den Verzicht auf eine verstärkte Sekretionsrate in den einzelnen Zellen, die Gefahr einer unkontrollierten Renin-Freisetzung minimiert wird. Zudem bleibt auf diese Weise die Möglichkeit einer kurzfristigen relativen Erhöhung der Renin-Sekretionsrate bestehen. Durch Erhöhung der Anzahl an Renin-bildenden Zellen wird dagegen eine längerfristige Anpassung bewirkt.

Der Prozess der metaplastischen Transformation von glatten Muskelzellen zu Renin-produzierenden Zellen wird auch als retrograde Rekrutierung bezeichnet (Gomez *et al.*, 1990). Er geht einher mit strukturellen Veränderungen der Zelle, die sich zunächst am deutlichsten in einer Vergrößerung des endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparates bemerkbar machen. Es folgt das Auftreten erster Renin-haltiger Vesikel und das Verschwinden von Myofilamenten in der Zelle. In vollständig ausdifferenzierten Reninzellen findet sich nur noch ein geringer Anteil an Myofilamenten, die Zelle verliert ihre Fähigkeit zur Kontraktion und ändert ihre Gestalt von der spindelförmigen glatten Muskelzelle zur kuboiden Form der Renin-sekretierenden Zelle (Cain und Kraus, 1971; Cantin *et al.*, 1977).

Sobald die Stimulation des RAAS vorüber ist, folgt dagegen wiederum eine Umwandlung vom sekretorischen zum kontraktile Zelltyp, der wieder alle Eigenschaften der glatten Muskelzelle zeigt (Cantin *et al.*, 1977). Früher nahm man an, dass sich alle Reninzellen aus glatten Muskelzellen entwickelt haben (Keeton und Campell, 1980; Taugner und Hackenthal, 1989). Neuere Ergebnisse weisen jedoch darauf hin, dass es Renin-exprimierende Vorläuferzellen gibt, aus denen sich sowohl die juxtaglomerulären Zellen als auch glatte Muskelzellen entwickeln (Sequeira-Lopez *et al.*, 2001; Sequeira-Lopez *et al.*, 2004).

Die zellulären Mechanismen, die die Umwandlung glatter Muskelzellen und anderer Nierenzellen (s. 1.5.3) in Renin-produzierende Zellen steuern, sind bisher noch nicht ausreichend beschrieben. Diskutiert wird die Beteiligung von microRNAs an der Ausdifferenzierung und Aufrechterhaltung des Reninzell-Phänotyps. MicroRNAs sind kleine, 10-22 Nukleotide lange, nicht kodierende RNAs, die in der Lage sind, die Expression von Genen auf post-transkriptionaler Ebene zu regulieren. Die Reninzelllinien-spezifische Deletion der Endoribonuklease Dicer, die für die Biogenese von microRNAs notwendig ist, führte in Mäusen zu einem Phänotyp mit nahezu keinen Renin-positiven Zellen, einer geringeren Renin-mRNA-Expression sowie niedrigeren Plasma-Renin-Konzentrationen und erniedrigtem Blutdruck (Sequeira-Lopez *et al.*, 2010). Medrano *et al.* (2011) konnten in diesem Zusammenhang zwei spezielle microRNAs, miR-330 und miR-125b-5p, identifizieren, die das genetische Programm steuern sollen, das für die Ausdifferenzierung zur Renin-produzierenden Zelle verantwortlich ist. Auch eine Signalübertragung über den Notch-Signalweg scheint an der Ausbildung des Reninzell-Phänotyps beteiligt (Castellanos-Rivera *et al.*, 2011). Mäuse mit einer Reninzelllinien-spezifischen Deletion des Transkriptionsfaktors RBP-J, der durch Notch aktiviert wird, zeigen einen Phänotyp mit wenigen Reninzellen, erniedrigter Renin-Genexpression und niedrigem Plasma-Renin sowie erniedrigtem Blutdruck. Auch die Rekrutierung von glatten Muskelzellen zu voll ausdifferenzierten Renin-produzierenden Zellen war in diesen Mäusen gestört (Castellanos-Rivera *et al.*, 2011). Für das Anschalten des Reninzell-spezifischen Programms und damit die Umwandlung in eine Renin-produzierende Zelle scheint auch der cAMP-Signalweg von besonderer Bedeutung. In isolierten Gefäßen und einzelnen Gefäßzellen der Rattenniere zeigte sich nach

Stimulierung der Adenylylzyklase mit Forskolin ein Anstieg der Renin-mRNA und des freigesetzten Renins durch eine Zunahme der Anzahl Renin-produzierender Zellen (Everett *et al.*, 1990). Experimente mit Label-markierten glatten Muskelzellen aus der Reninzelllinie zeigten, dass diese nach Zugabe von cAMP-Analoga begannen, das Renin-Gen zu transkribieren und sich so in Renin-produzierende Zellen umzuwandeln. Dies ist begleitet von einer Herab-Regulation Glattnmuskel-spezifischer Gene wie  *$\beta$ -smooth muscle actin* und *myosin heavy chain* (Pentz *et al.*, 2008). Die Wirkung von cAMP auf die Genexpression wird vermutlich über Phosphorylierung des *cAMP responsive element (CRE) binding (CREB)*-Proteins vermittelt, das im Kern durch Bindung an die CRE-Region im Renin-Promoter-Bereich die Expression des Renin-Gens reguliert (Pentz *et al.*, 2008). Zudem wurden in den letzten Jahren noch weitere Transkriptionsfaktoren charakterisiert, die an die *enhancer*- oder Promotor-Region des Renin-Gens binden, und so dessen Transkription regulieren (Desch *et al.*, 2010; Glenn *et al.*, 2008; Itani *et al.*, 2009; Lopez und Gomez, 2010). Im Zuge der Ausdifferenzierung zur Renin-bildenden Zelle, werden neben dem Renin-Gen noch eine Vielzahl weiterer Gene reguliert. Brunskill *et al.* (2011) präsentierten vor kurzem durch Untersuchung FACS (*fluorescence activated cell sorting*)-isolierter Reninzellen eine umfassende Auflistung Reninzell-spezifisch hochregulierter Gene.

### 1.5.3 Weitere Renin-produzierende Zellen der Niere

Neben den glatten Muskelzellen der afferenten Arteriole gibt es in der Niere noch andere Zellen, die unter bestimmten Bedingungen in der Lage sind, Renin zu produzieren. Bei lang andauernder Stimulierung des RAAS werden beispielsweise weitere Gefäßzellen zur Produktion von Renin angeregt. Dies sind glatte Muskelzellen der *Interlobular*-Arterien sowie Zellen der efferenten Arteriole (Faarup, 1965; Taugner *et al.*, 1981). Außerhalb der Gefäße zeigte sich Renin-Produktion bei starker Stimulierung des RAAS auch im Bereich des extra- und intraglomerulären Mesangiums (Barajas und Lata, 1963; Dunihue und Boldosser, 1963; Bohle *et al.*, 1984; Christensen *et al.*, 1989) sowie in interstitiellen Zellen (Berg *et al.*, 2013). Selten wird Renin auch in Zellen des distalen Tubulus gefunden (Taugner *et al.*, 1979; Prieto-Carrasquero *et al.*, 2009). Neuere Studien zur Verfolgung der Abstammungslinie Renin-produzierender Zellen weisen darauf hin,

dass es sich bei diesen Renin-produzierenden Zellen um Zellen handelt, die bereits während der fötalen Entwicklung Renin synthetisierten und die sich später in andere Zelltypen differenzierten. Bei starker Stimulation des RAAS können diese dann auch in der adulten Niere wieder zur Produktion von Renin angeregt werden (Sequeira-Lopez *et al.*, 2004).

Es ist eine Reihe von Krankheiten bekannt, die zu einer starken Stimulierung des RAAS führen. Hier findet sich jeweils als Teil des Krankheitsbildes ein vergrößerter juxtaglomerulärer Apparat mit Renin-produzierenden Zellen im Bereich des extraglomerulären Mesangiums als Ausdruck einer gesteigerten Renin-Produktion. Ein Beispiel ist das Barrter Syndrom, bei dem eine gestörte Cl<sup>-</sup>-Rückresorption zu einem verminderten Blutdruck führt (Gill und Barrter, 1978). Hier zeigt sich eine Stimulierung des RAAS mit stark vergrößerten juxtaglomerulären Zellkomplexen in der Niere. Innerhalb derer finden sich Renin-Vesikel nicht nur in den Zellen der Gefäßwand der afferenten Arteriole, sondern auch in Zellen des extraglomerulären Mesangiums (Barrter *et al.*, 1962). In den Niere ließen sich außerdem erhöhte Prostaglandin-E<sub>2</sub>-Werte feststellen (Zusman, 1980), die möglicherweise an der Stimulation des RAAS beteiligt sind (s. 1.3.2). Es ist auch das sog. Pseudo-Barrter-Syndrom bekannt, bei dem Missbrauch von Diuretika und Laxantien zu ähnlichen Symptomen wie beim Barrter-Syndrom führt. Auch hier bilden sich extraglomeruläre Mesangialzellen in Renin-bildende Zellen um (Christensen *et al.*, 1989). Ähnlich wie beim Barrter-Syndrom findet sich auch bei Krankheiten wie *Anorexia nervosa*, bedingt durch den auftretenden Elektrolyt- und Volumenmangel, eine Stimulation des RAAS mit einer Zunahme Renin-bildender Zellen im Bereich des extraglomerulären Mesangiums (Riemenschneider und Bohle, 1983). Auch bei Morbus Addison-Patienten fanden sich deutlich vergrößerte juxtaglomeruläre Zellkomplexe (Bohle *et al.*, 1984). Morbus Addison führt zu einem Funktionsverlust der Nebenniere, der u. a. mit einem Mangel an Aldosteron und daraus folgender Hypotonie einhergeht.

Einen besonders starken Stimulus für die Rekrutierung von zusätzlichen Reninzellen stellen auch genetische Defekte innerhalb der RAAS-Kaskade dar. In Mäusen mit deletiertem Angiotensinogen (Kim *et al.*, 1995; Niimura *et al.*, 1995; Nagata *et al.*, 1996; Kihara *et al.*, 1998), *angiotensin converting enzyme* (ACE) (Krege *et al.*, 1995; Esther *et al.*, 1996; Hilgers *et al.*, 1997), AT1a-Rezeptor

(Inokuchi *et al.*, 2001) sowie AT1a- und AT1b-Rezeptor (Oliverio *et al.*, 1998; Tsuchida *et al.*, 1998) findet sich jeweils eine starke Hyperplasie der Renin-bildenden Zellen. Diese finden sich nicht nur im juxtaglomerulären Bereich, sondern auch weiter entfernt vom Glomerulus, zum einen innerhalb der Gefäßwand der afferenten Arteriole und zum anderen auch in mehrschichtigen Zelllagen um die präglomerulären Gefäße herum. In den beschriebenen Mäusen zeigen sich neben der Hyperplasie der Renin-produzierenden Zellen, schwere strukturelle Störungen während der Entwicklung der Niere. Nach der Geburt werden die Nieren hydronephrotisch, es entwickelt sich eine schlecht ausgebildete Medulla zusammen mit einer atrophischen Papille und einem erweiterten Nierenbecken. In den Nieren zeigen sich Anzeichen für interstitielle Fibrose und sklerotische Glomeruli. Die RAAS-defizienten Mäuse sind hypoton und zeigen, mit den strukturellen Veränderungen einhergehend, Probleme bei der Aufkonzentrierung des Urins. Im Besonderen fällt in allen Genotypen auch eine Verdickung der *Media*-Schicht der renalen arteriellen Blutgefäße durch eine Zunahme an Zellen innerhalb der Gefäßwand auf. Wie dies in Zusammenhang mit den hyperplastischen Reninzellen steht, ist noch nicht geklärt, jedoch zeigt sich derselbe Phänotyp auch in Mäusen mit Deletion des *Ren1c*-Gens (Takahashi *et al.*, 2005). Dies deutet darauf hin, dass nicht das Renin-Protein an sich für die Verdickung der arteriellen Gefäße verantwortlich ist. Allerdings zeigten sich in Nieren von Mäusen, in denen alle Zellen der Reninzelllinie durch ein Zellgift abgetötet wurden, keine verdickten Gefäße, was dafür spricht, dass die Renin-produzierenden Zellen über einen Renin-unabhängigen Weg an der Hyperplasie der Gefäßwände beteiligt sind (Pentz *et al.*, 2004).

In Mäusen mit einer Deletion des Aldosteronsynthase (AS)-Gens ließ sich ebenfalls eine starke Hyperplasie Renin-bildender Zellen beobachten (Makhanova *et al.*, 2006). Wie die oben beschriebenen Mäuse waren AS<sup>-/-</sup> Mäuse hypoton, jedoch zeigte sich in diesem RAAS-defizienten Genotyp die Morphologie der fertig entwickelten Niere relativ unauffällig im Vergleich zum Wildtyp. Die Nieren der AS<sup>-/-</sup> Mäuse waren allenfalls leicht hydronephrotisch und wiesen keine Verdickungen im Bereich der arteriellen Gefäße auf. Die hyperplastischen Reninzellen fanden sich im Bereich um die afferenten Arteriolen und zeigten sich zusammen mit einer erhöhten Renin-mRNA-Expression und erhöhten Plasma-

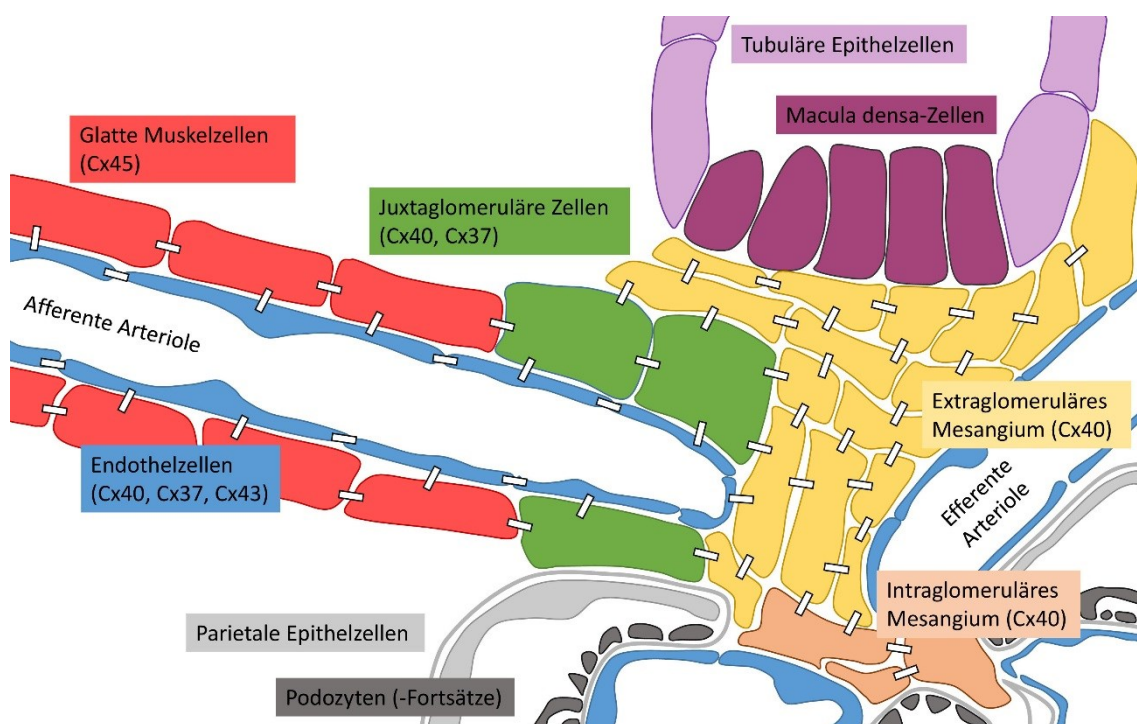
Renin-Werten (Lee *et al.*, 2005; Makhanova *et al.*, 2006). Verschiedene Faktoren können an dieser kompensatorischen Überproduktion von Renin beteiligt sein. Da sich in den Nieren von AS<sup>-/-</sup> Mäusen erhöhte COX-2-mRNA Werte feststellen ließen, ist anzunehmen, dass eine Aktivierung von COX-2 an diesem Prozess beteiligt ist (Makhanova *et al.*, 2006). COX-2 wird in den *Macula densa*-Zellen als Antwort auf einen veränderten tubulären Salzgehalt, wie er in AS<sup>-/-</sup> Mäusen zu finden ist, aktiviert (Harris *et al.*, 1994; Peti-Peterdi und Harris, 2010). Dies führt zur Bildung von Prostaglandinen, die nachweislich die Renin-Synthese und -Sekretion stimulieren (Jensen *et al.*, 1996). Interessanterweise führt das Füttern einer Hochsalzdiät in AS<sup>-/-</sup> Mäusen dazu, dass der Elektrolythaushalt normalisiert wird und die Expression von COX-2 und Renin wieder auf den Normalwert gesenkt wird (Makhanova *et al.*, 2006). Dies bestätigt die Möglichkeit einer COX-2-vermittelten Renin-Stimulation in AS<sup>-/-</sup> Mäusen.

## 1.6 Connexine im juxtaglomerulären Bereich

Es ist bereits lange bekannt, dass die verschiedenen Zelltypen des juxtaglomerulären Apparates über Gap-Junctions miteinander in Verbindung stehen (s. Abb. 1.4). Auf diese Weise sind die Renin-produzierenden juxtaglomerulären Zellen sowohl untereinander verbunden (Buhrle *et al.*, 1984) als auch mit den benachbarten Endothel-, glatten Muskel- und extraglomerulären Mesangialzellen (Mink *et al.*, 1984; Taugner *et al.*, 1984 a; Taugner *et al.*, 1984 b, Taugner *et al.*, 1978). Gap-Junctions sind aus Connexin (Cx)-Proteinen aufgebaut, von denen jeweils sechs einzelne Proteine einen Halbkanal (Connexon) in der Zellmembran bilden. Dieser kann sich mit einem Halbkanal einer angrenzenden Zelle zusammenlagern, wodurch das Zytoplasma der Zellen direkt miteinander verbunden wird. Als Gap-Junction bezeichnet man die lokale Ansammlung einer Vielzahl derartiger Zell-Zell-Kanäle. Im Menschen sind 21 und in der Maus 20 unterschiedliche Isoformen von Connexin-Proteinen bekannt, die miteinander homo- und heteromere Kanäle bilden können (Sohl und Willecke, 2004). Diese unterscheiden sich, je nachdem aus welchen Connexinen sie aufgebaut sind, in ihrer Porengröße und Permeabilität. Connexone bzw. Gap-Junctions erlauben den Durchtritt kleiner Moleküle bis zu einer Molekülmasse von 1 kDa. Neben der Größe



beeinflusst auch die Ladung der Moleküle die Selektivität der Gap-Junctions. Durch Diffusion können Ionen und kleine Moleküle so selektiv direkt von einer Zelle auf die andere übertragen werden. Über die Übertragung von *second messenger* Molekülen wie cAMP und  $\text{Ca}^{2+}$  sind Gap-Junctions an der Weiterleitung von Signalen innerhalb von Zellverbänden beteiligt. Es ist auch bekannt, dass sich Connexone nicht immer zu Gap-Junctions zusammenschließen müssen. Sie können auch als einfache Membrankanäle dienen, die nicht an andere Zellen gekoppelt sind. Auf diese Weise können über Connexone Signal-Moleküle auch in den extrazellulären Raum freigesetzt werden.



**Abb. 1.4: Gap-Junctions im juxtaglomerulären Bereich.** Juxtaglomeruläre Zellen, glatte Muskelzellen, Endothelzellen sowie extra- und intraglomeruläres Mesangium sind im juxtaglomerulären Bereich über Gap-Junctions (dargestellt durch weiße Rechtecke) miteinander verbunden. Diese können je nach Zelltyp aus unterschiedlichen Connexinen (Cx) aufgebaut sein.

In den juxtaglomerulären Zellen findet sich hauptsächlich Cx40 und zu einem geringeren Anteil Cx37 und möglicherweise Cx43 (Hwan Seul und Beyer, 2000; Arensbak *et al.*, 2001; Haefliger *et al.*, 2004; Zhang und Hill, 2005). Die Kombination dieser Connexine findet sich allerdings nur in den juxtaglomerulären Reninzellen. Bei Stimulierung des RAAS rekrutierte Reninzellen der afferenten Arteriole sowie die fötalen Reninzellen der größeren Arteriolen zeigen jeweils nur das Vorkommen von Cx40, was die Expression dieses Proteins als grundlegende

Eigenschaft der Renin-produzierenden Zellen erscheinen lässt (Kurtz *et al.*, 2009 b).

Durch Experimente an Mäusen mit spezifisch deletierten Connexin-Proteinen wurde der Einfluss der verschiedenen Connexine auf die Renin-Sekretion in den juxtaglomerulären Zellen untersucht. Versuche mit Cx37-defizienten Mäusen machten deutlich, dass durch Cx37 gebildete Gap-Junctions, die neben den Renin-bildenden Zellen auch in präglomerulären Endothelzellen auftreten (Arensbak *et al.*, 2001; Kurtz, 2012), die funktionellen Eigenschaften der juxtaglomerulären Zellen nicht beeinflussen und keine entscheidende Rolle bei der Regulation der Renin-Sekretion spielen (Simon und McWorther, 2003; Wagner *et al.*, 2009). Auch Cx43 findet sich im Endothel der afferenten Arteriole und möglicherweise in den juxtaglomerulären Zellen (Haefliger *et al.*, 2001 und 2004; Zhang und Hill, 2004). Der Austausch von Cx43 mit Cx32, das sich im Normalfall nicht im juxtaglomerulären Bereich findet (Wagner und Kurtz, 2012), führte in Mäusen zu Beeinträchtigungen in der Regulation der Renin-Sekretion (Haefliger *et al.*, 2006). Die Mäuse hatten erniedrigte Plasma-Renin-Konzentrationen und antworteten auf einen erniedrigten renalen Perfusionsdruck im Zuge einer unilateralen Nierenstenose nicht mit einer Erhöhung der Renin-Sekretion (Haefliger *et al.*, 2006). Möglicherweise bezieht sich der Einfluss von Cx43 aber nicht auf die juxtaglomerulären Reninzellen, sondern auf die Endothelzellen der afferenten Arteriole (Wagner und Kurtz, 2012). Diese sind vermutlich in der Lage, die Renin-Sekretion über die Freisetzung von Prostaglandinen zu beeinflussen (Imanishi *et al.*, 2001). Versuche mit Mäusen, in denen Cx43 Reninzell-spezifisch ausgeknockt wurde, zeigten in Übereinstimmung mit dieser These keine Veränderungen in der Kontrolle der Renin-Sekretion (Gerl *et al.*, 2014).

Deletion von Cx40, dem dominierenden Gap-Junction-bildenden Protein der Renin-produzierenden Zellen, hatte Konsequenzen sowohl für die Funktion als auch für die Lokalisation der Renin-produzierenden Zellen (Krattinger *et al.*, 2007; Kurtz *et al.*, 2007; Wagner *et al.*, 2007). Cx40-defiziente Mäuse zeigten sich hypotensiv (De Wit *et al.*, 2003), wiesen jedoch trotzdem erhöhte Plasma-Renin-Werte auf (Krattinger *et al.*, 2007, Wagner *et al.*, 2007). Der Blutdruck ließ sich dabei durch Inhibitoren des RAAS, wie Angiotensin II-AT1-Rezeptor-Blocker oder ACE-Inhibitoren, korrigieren, was darauf hindeutet, dass die erhöhten Renin-Werte die



Ursache des erhöhten Blutdrucks in diesen Mäusen sind (De Wit *et al.*, 2003; Schweda *et al.*, 2009; Wagner *et al.*, 2007). Dass trotz des hohen Blutdrucks in Cx40-defizienten Mäusen vermehrt Renin freigesetzt wird, könnte darauf hindeuten, dass die Weiterleitung inhibitorischer Signale an juxtaglomeruläre Zellen in Abwesenheit von Cx40 nicht mehr funktioniert. Einen Hinweis darauf geben auch Studien, die zeigen, dass sich in Cx40-defizienten Mäusen die Reninsekretion durch Angiotensin II nicht mehr in gleichem Maße inhibieren lässt wie in Wildtyp-Mäusen (Wagner *et al.*, 2007). Besonders deutlich zeigte sich auch, dass die inverse Beziehung zwischen Blutdruck und Renin-Sekretion nicht mehr zu beobachten war. In isoliert perfundierten Nieren von Cx40-defizienten Mäusen führte eine Erhöhung des Perfusionsdrucks zu einer gesteigerten Renin-Sekretionsrate, während in Wildtyp-Mäusen eine entgegengesetzte Beziehung zu beobachten war (Krattinger *et al.*, 2007, Wagner *et al.*, 2007). Andererseits war die Regulation der Renin-Sekretion durch Katecholamine und Änderungen im Salzhaushalt in Cx40-defizienten Mäusen nicht verändert, was deutlich machte, dass die Kontrolle der Renin-Sekretion auch in Abwesenheit von Cx40 nicht vollständig verloren ging (Krattinger *et al.*, 2007, Wagner *et al.*, 2007). Da Cx40 auch Gap-Junctions in den Endothelzellen der afferenten Arteriole bildet, wurde untersucht, wie eine Endothelzell-spezifische Deletion von Cx40 die Renin-Sekretion beeinflusst. Hierbei stellte sich heraus, dass in diesen Mäusen die Kontrolle der Renin-Sekretion im Vergleich zum Wildtyp nicht beeinträchtigt war (Wagner *et al.*, 2010). Mäuse mit einer Reninzell-spezifischen Deletion von Cx40 zeigten dagegen den vollständigen Phänotyp der globalen Deletion von Cx40 (Wagner *et al.*, 2010).

Während viele Experimente zeigten, dass Cx40 in den Renin-bildenden Zellen eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Renin-Sekretion spielt, ist bisher noch unbekannt, über welchen Mechanismus Cx40 daran beteiligt ist. Möglicherweise spielt die Weiterleitung von Kalzium-Ionen über Cx40-Gap-Junctions eine wichtige Rolle. Die Erhöhung der Kalzium-Konzentration innerhalb Renin-bildender Zellen ist als starker Inhibitor der Renin-Sekretion bekannt (s. 1.4.2). Im Zuge eines ansteigenden renalen Perfusionsdrucks nimmt in Reninzellen von Wildtyp-Nieren die intrazelluläre Kalzium-Konzentration zu (Scholz *et al.*, 1994; Schweda *et al.*, 2000; Lai *et al.*, 2011), was auf einen erhöhten transmembranen Kalzium-Einstrom

zurückzuführen ist und inhibierend auf die Renin-Sekretion wirkt (Kurtz und Penner, 1989; Yao *et al.*, 2003). Setzt man dagegen die extrazelluläre Kalzium-Konzentration herab, führt dies dazu, dass die inverse Beziehung zwischen Perfusionsdruck und Renin-Sekretion in der Wildtyp-Niere verloren geht. Ein ansteigender Perfusionsdruck führt in Abwesenheit von Kalzium zu tendenziell höheren Renin-Sekretions-Werten (Fray und Park, 1986; Scholz *et al.*, 1994). Diese fehlende Kontrolle der Renin-Sekretion durch den Perfusionsdruck findet man so auch in Cx40-defizienten Mäusen, was darauf hindeutet, dass über Cx40 möglicherweise ein inhibierendes Kalzium-Signal vermittelt wird (Wagner *et al.*, 2007). Unabhängig vom Perfusionsdruck führt eine Absenkung des extrazellulären Kalziums in Wildtyp-Nieren zu einer Stimulierung der Renin-Sekretion, was auf den fehlenden inhibitorischen Effekt von Kalzium zurückzuführen ist (Van Dongen und Peart, 1974; Ichihara *et al.*, 1995; Kurtz *et al.*, 1986 b). In Cx40-defizienten Mäusen findet sich dieser Effekt dagegen nur in abgeschwächter Form (Wagner *et al.*, 2007; Schweda *et al.*, 2009). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Cx40 an der Weiterleitung eines Kalzium-Signals zwischen den Renin-produzierenden Zellen beteiligt ist (Wagner und Kurtz, 2013). Dass die Ausbreitung von Kalzium wichtig für einen koordinierten Sekretionsvorgang sein kann, zeigte sich beispielsweise auch an den Insulin-sekretierenden  $\beta$ -Zellen des Pankreas (Ravier *et al.*, 2005). Neben seiner Eigenschaft als Kanal-bildendes Protein, das die Zellularräume benachbarter Zellen miteinander verbindet, ist es auch möglich, dass Cx40 seine Wirkung auf die Renin-Sekretion über andere Funktionen vermittelt. So könnte Cx40 auch als Halbkanal wirken, über den beispielsweise ATP, im Sinne einer parakrinen Sekretion freigesetzt wird. Dieses könnte an purinerge Rezeptoren von benachbarten Zellen binden und hier für einen Anstieg der intrazellulären Kalzium-Konzentration sorgen (Peti-Peterdi, 2006; Toma *et al.*, 2008; Sorensen und Holstein-Rathlou, 2012). Man muss auch die Möglichkeit in Betracht ziehen, dass Cx40-Halbkanäle als Mechanorezeptoren dienen, die zug- oder druckabhängig, den Einstrom von Kalzium in die Renin-bildenden Zellen beziehungsweise eine Freisetzung von ATP vermitteln (Li *et al.*, 2011). Eine derartige Wirkungsweise von Connexin-Halbkanälen ist bereits für andere Connexine bekannt (Liu *et al.*, 2006). Experimente mit nicht selektiven Gap-Junction-Blockern, deuten allerdings darauf hin, dass die Kontrolle der Renin-Sekretion eher über einen Gap-Junction-vermittelten Mechanismus als über

Halbkanäle abläuft (De Vriese *et al.*, 2002; Wagner *et al.*, 2007; Takenaka *et al.*, 2008;). Um zu untersuchen, inwiefern die veränderte Renin-Sekretion in Cx40-defizienten Mäusen von den spezifischen Eigenschaften von Cx40 abhängt, wurden Cx40-*knock in*-Cx45-Mäuse untersucht, in denen statt Cx40 Cx45 unter der Kontrolle des Cx40-Promotors exprimiert wurde (Kurtz *et al.*, 2009 a; Schweda *et al.*, 2009). Diese Mäuse zeigten zwar einen ähnlichen Phänotyp wie Cx40-defiziente Mäuse, allerdings in deutlich abgeschwächter Form, was darauf hindeutete, dass die Regulation der Renin-Freisetzung nicht abhängig von den speziellen Eigenschaften des Cx40-Proteins ist. Eine vollständige Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps durch Cx45 war allerdings nicht möglich (Kurtz *et al.*, 2009 a; Schweda *et al.*, 2009).

Neben den Konsequenzen für die funktionellen Eigenschaften, hat das Fehlen von Cx40 auch einen Einfluss auf die Lokalisation der Renin-produzierenden Zellen (Kurtz *et al.*, 2007). Während sich diese im Normalfall innerhalb der *Media*-Schicht der präglomerulären Gefäße finden, zeigen sie sich in Cx40-defizienten Mäusen nur außerhalb der Gefäßwände. Diese ektopischen Renin-produzierenden Zellen befinden sich im Bereich des extraglomerulären Mesangiums und im periglomerulären Interstitium. In den präglomerulären Gefäßen finden sich dagegen nur noch glatte Muskelzellen (Kurtz *et al.*, 2007). Es zeigte sich dabei, dass mit zunehmendem Alter die Anzahl der Renin-produzierenden Zellen im Bereich einiger Glomeruli anstieg, während sich an anderen Glomeruli nur noch wenige Reninzellen fanden (Kurtz *et al.*, 2007). Die abnorme Lokalisation der Reninzellen könnte auch ein Grund für die fehlende Kontrolle der Renin-Sekretion sein, jedoch zeigten Experimente, dass auch nach Zugabe von nicht-selektiven Gap-Junction-Blockern die Regulation der Renin-Sekretion durch den Perfusionsdruck nicht aufrechterhalten werden konnte (Wagner *et al.*, 2007).

## 1.7 Zielsetzung

Während starker Stimulation des RAAS werden zusätzlich zu den retrograd rekrutierten Reninzellen der afferenten Arteriole weitere Zellen der Niere zur Produktion von Renin angeregt. Bei genetischen Defekten innerhalb des RAAS tritt eine Hyperplasie Renin-bildender Zellen auf, welche zu einem großen Teil im

perivaskulären Bereich um die afferente Arteriole zu finden sind. Über die Herkunft sowie die strukturellen und funktionellen Eigenschaften dieser Zellen ist bisher noch nichts bekannt. Diese Arbeit soll der genaueren Charakterisierung der perivaskulären Reninzellen dienen. Als Tiermodell mit einem genetischen Defekt des RAAS, der zu hyperplastischen Reninzellen führt, werden Mäuse mit einer Deletion des Aldosteronsynthase-Gens verwendet ( $AS^{-/-}$ ). Im Gegensatz zu anderen RAAS-defizienten Mäusen zeigen  $AS^{-/-}$ -Mäuse strukturell weitestgehend unveränderte Nieren und besitzen weiterhin die Fähigkeit der Angiotensin II-Produktion.

Anhand von verschiedenen Altersstadien soll die Hyperplasie der perivaskulären Reninzellen in  $AS^{-/-}$ -Mäusen altersabhängig untersucht und die Struktur der Zellen analysiert werden. Der immunhistochemische Nachweis verschiedener Zellmarker-Proteine dient dazu, den Zelltyp der perivaskulären Reninzellen klarer zu definieren und kann Hinweise auf die Herkunft der Zellen geben. Eine funktionelle Untersuchung der Renin-Sekretion in  $AS^{-/-}$ -Mäusen soll zeigen, wie sich die Freisetzung von Renin in perivaskulären Reninzellen regulieren lässt.

Das Gap-Junction-bildende Protein Connexin 40 ist von großer funktioneller Relevanz für die Renin-produzierenden Zellen der Niere. Zum einen ist es wichtiger Bestandteil der negativen Rückkopplungs-Kontrolle der Reninsekretion durch den renalen Perfusionsdruck. Verlust von Cx40 führt trotz erhöhtem Blutdruck zu einer verstärkten Renin-Freisetzung *in vivo*. Zum anderen ist Cx40 essentiell für die korrekte Positionierung der Renin-bildenden Zellen im juxtaglomerulären Teil der afferenten Arteriole. Verlust von Cx40 führt zu einer Verlagerung der Renin-bildenden Zellen in den Bereich des periglomerulären Interstitiums.

Die Bedeutung von Cx40 für die perivaskulären Reninzellen ist bisher nicht geklärt und sollte daher im zweiten Teil dieser Arbeit untersucht werden. Durch Deletion des *Cx40*-Gens konnte in  $AS^{-/-}$ -Mäusen die Funktion von Cx40 überprüft werden.

$AS^{-/-}$   $Cx40^{-/-}$ -Mäuse sollen ebenfalls altersabhängig untersucht und die Struktur und Lokalisierung der Reninzellen analysiert werden. Auch hier erfolgt eine Charakterisierung der Reninzellen mittels Zellmarker-Proteine. Die funktionelle Bedeutung von Cx40 für die perivaskulären Reninzellen wird durch eine Analyse der Renin-Sekretions-Kontrolle untersucht.

## 2. Material und Methoden

## 2.1 Material

### 2.1.1 Geräte

<b><u>Gerät</u></b>	<b><u>Hersteller</u></b>
Autoklav	DX-23, Systec, Wetztenberg
Blutdruck-Messgerät	Non-Invasive Blood Pressure Monitoring System, TSE Systems, Bad Homburg
Computer	Optiplex 780, Dell, Frankfurt a. Main
Eismaschine	Ziegra Eismaschinen, Isernhagen
Filtersets	
Cy2-Filter:	Filter Set 38, Zeiss, Jena Anregung: 450-490 nm Emission: 500-550 nm
TRITC-Filter:	Filter Set 43, Zeiss, Jena Anregung: 533-558 nm Emission: 570-640 nm
Cy5-Filter:	Filter Set 50, Zeiss, Jena Anregung: 625-655 nm Emission: 665-715 nm
Fluoreszenzlampe	X-Cite 120, EXFO Life Sciences & Industrial Division, Mississauga, Canada
Gel-Elektrophorese-System	Compact M, Biometra, Göttingen
Homogenisator	Ultra-Turrax T25, Janke & Kunkel, Staufen
Kühl- und Gefrierschränke	Hera freeze, Thermo electron corporation, Langenselbold Premium NoFrost, Liebherr, Biberach a. d. Riss Super Energiesparer, Privileg, Stuttgart
Kamera	AxioCam MRm, Zeiss, Jena TEM-1000, TVIPS-Tietz, Gauting

Magnetrührer	MR80 Heidolph, Schwabach
Mikroskope	Axiostar 1122-100, Zeiss, Jena Axiovert 200M, Zeiss, Jena LSM 710, Zeiss, Jena Phillips CM12 TEM, Fei & Co, Eindhoven, Niederlande
Mikrotome	Rotationsmikrotom RM2165, Leica, Wetzlar Rotationsmikrotom RM2265, Leica, Wetzlar Ultramikrotom EM UC7, Leica, Wetzlar
Mikrowelle	Leica EM AMV, Leica, Wetzlar
PCR-Geräte	Labcycler, Sensquest, Göttingen
Perfusionspumpe	323, Watson Marlow, Falmouth, England Lightcycler LC480, Roche, Mannheim
pH-Meter	HI 2211 pH/ORP Meter, Hanna Instruments, Kehl a. Rhein
Photometer	Biophotometer plus, Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Pipetman P10, P20, P100, P200, P1000, Gilson, Middleton, USA
Reinwasseranlage	MilliQ Plus PF, Millipore, Schwalbach
Scantisch	Motorisierter Märzhäusertisch (MAC 5000 Controler), Ludl Electronic Products, München
Schüttler	Sm25, Edmund Bühler, Hechingen Thermomixer Compact, Eppendorf, Hamburg
Spannungsquelle	Biometra Standard Power Pack P25, Biomedizinische Analytik, Göttingen
UV-Dunkelkammer	Fusion FX7, Vilber, Eberhardzell
UV-Leuchttisch	Fluorescent Tables, Renner, Dannstadt
Vortexgerät	Vortex-Genie 2, Scientific Industries, New York
Waagen	2214, Sartorius, Göttingen AB54, Mettler Toledo, Gießen VWR1502, Sartorius, Göttingen

Wärmeplatte	HI 1220, Leica, Wetzlar
	OTS40, Medite Medizintechnik, Burgdorf
Wärmeschrank	Modell 300, Memmert, Schwabach
Wasserbad	1083, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Zentrifugen	5417R, Eppendorf, Hamburg
	5424, Eppendorf, Hamburg
	Haematokrit 210, Hettich, Tuttlingen
	Z300, Hermle Labortechnik, Wehingen

### 2.1.2 Verbrauchsmaterial

<b><u>Produkt</u></b>	<b><u>Hersteller</u></b>
Deckgläschen	A. Hartenstein, Würzburg
Filter	Sartorius, Göttingen
Gewebe-Einbettkassetten	Labonord, Mönchengladbach
Glaswaren	Roth, Karlsruhe
	Schott, Mainz
Hämatokritkapillaren	Brandt, Wertheim
Handschuhe	Roth, Karlsruhe
Kupfer Grids	Plano, Wetzlar
Light Cycler 480 Multiwell Platten 96	Roche, Mannheim
Liquid Blocker	Science Services, München
Objektträger, Superfrost Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig
Parafilm	American National Can, Greenwich, USA
Pipettenspitzen mit und ohne Filter	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäße (Eppendorf-Cup) 0,2 ml, 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäße (Falcon-Tube) 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Silikonkautschuk Gießformen	Roth, Karlsruhe



### 2.1.3 Chemikalien, Enzyme und Kits

<b><u>Produkt</u></b>	<b><u>Hersteller</u></b>
Agarose	Peqlab, Erlangen
Chloroform	Acros Organics, Geel, Belgien
Bleicitrat Ultrastain II	Leica, Wetzlar
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Fluka, Neu-Ulm
DNA-Längenstandard (100 bp DNA Ladder)	Thermo Scientific, Bremen
dNTPs (Mix, 10 mM)	Promega, Mannheim
Epoxy-Einbett-Kit	Fluka, Neu-Ulm
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- N,N,N',N'-tetraacetat (EGTA)	Sigma, Deisenhofen
Ethanol	Merck, Darmstadt
Essigsäure (100 %)	Merck, Darmstadt
First Strand Buffer (5 x)	Invitrogen, Karlsruhe
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Glutaraldehyd (25 %)	Merck, Darmstadt
Glycergel Mounting Medium	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark
GoTaq DNA Polymerase (5 U/μl)	Promega, Mannheim
GoTaq Reaction Buffer Green (5 x)	Promega, Mannheim
HCl	Merck, Darmstadt
Heparin	Rotexmedica, Trittau
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Isoproterenol	Sigma, Deisenhofen
KCl	Merck, Darmstadt
Ketamin	Bela-Pharm, Vechta
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
Maleinsäure	Merck, Darmstadt

Methanol	Merck, Darmstadt
M-MLV-Reverse Transkriptase (200 U/μl)	Promega, Mannheim
NaCl	Merck, Darmstadt
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
NaOH	Merck, Darmstadt
Oligo (dT) <sub>15</sub> -Primer	Promega, Mannheim
Paraffin	Leica, Wetzlar
Paraformaldehyd	Roth, Karlsruhe
Pikrinsäure	Merck, Darmstadt
Pioloform FN65 Pulver	Plano, Wetzlar
Pferdeserum (HS)	Sigma, Deisenhofen
RIA-Kit, RENCTK	DiaSorin, Saluggia, Italien
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
Ringer-Lösung	B. Braun, Melsungen
RNase-freies Wasser	Promega, Mannheim
SYBR®Green	Qiagen, Düsseldorf
TRIS	USB Corporation, Cleveland, USA
TRISure-Reagenz	Bioline, Luckenwalde
Triton X-100	Boehringer, Mannheim
Uranylacetat	Merck, Darmstadt
Xylazin	Serumwerk, Bernburg
Xylol	Merck, Darmstadt

### 2.1.4 Puffer und Lösungen

#### Bain-Fixierlösung

Pikrinsäure	0,04 M
Essigsäure	0,9 M
Formaldehyd	10 %

#### DEPC-H<sub>2</sub>O

0,1 % DEPC in H<sub>2</sub>O dd., schütteln, über Nacht geöffnet unter dem Abzug stehen lassen, dann autoklavieren;

#### Fixierlösung für Perfusion

PBS	
Paraformaldehyd	4 %

#### Fixierlösung für Perfusion (Transmissionselektronenmikroskopie)

PBS	
Glutaraldehyd	2 %

#### Maleatpuffer

TRIS	1,22 %
Maleinsäure	1,74 %
EDTA	0,89 %

#### PBS (*Phosphate Buffered Saline*)-Puffer

NaCl	136 mM
KCl	2,7 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	10,1 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,8 mM

#### TAE (TRIS-Acetat-EDTA)-Puffer

TRIS	40 mM
Essigsäure	20 mM
EDTA	1 mM

#### Tris/EDTA-Puffer

TRIS	10 mM
EDTA	1,3 mM

### 2.1.5 Primer

Die Primer für Genotypisierung und quantitative Echtzeit-PCR wurden von der Firma biomers.net GmbH (Ulm) in gewünschter Nukleotidabfolge synthetisiert und lyophilisiert geliefert. Durch Zugabe von nukleasefreiem Wasser wurde eine Konzentration von 100 pmol/μl eingestellt.

#### Primer für Genotypisierung:

Aldosteronsynthase:

<i>Name</i>	<i>Sequenz</i>
Aldosynth-For	5'-acc aga gcc caa atg tct ca-3'
Aldosynth-Rev	5'-ctg atg cat ctc cag gtg ta-3'
EGFP-Rev	5'-ctg aac ttg tgg ccg ttt ac-3'

Connexin 40:

<i>Name</i>	<i>Sequenz</i>
Cx40WT_314bp_sense	5'-ggg aga tga gca ggc cga ctt ccg gtg cg-3'
Cx40WT_314bp_antisense	5'-gta ggg tgc cct gga gga caa tct tcc c-3'
Cx40_494bp_sense	5'-gga tcg gcc att gaa caa gat gga ttg cac-3'
Cx40_494bp_antisense	5'-ctg atg ctc ttc gtc cag atc atc ctg atc g-3'

#### Primer für quantitative Echtzeit-PCR:

<i>Name</i>	<i>Sequenz</i>
Renin s	5'-atg aag ggg gtg tct gtg ggg tc-3'
Renin as	5'-atg cgg gga ggg tgg gca cct g-3'
GAPDH s	5'-atg cca tca ctg cca ccc aga ag-3'
GAPDH as	5'-act tgg cag gtt tct cca ggc gg-3'

### 2.1.6 Antikörper

#### Primär-Antikörper:

<i>Name</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Verdünnung</i>
<i>Chicken-anti-Renin</i>	Davids Biotech., Regensburg	1:400
<i>Goat-anti-AKR1B7</i>	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA	1:200
<i>Goat-anti-Sm22</i>	Abcam, Cambridge, UK	1:300
<i>Mouse-anti-Glatt-muskelaktin (<math>\alpha</math>-SMA)</i>	Abcam, Cambridge, UK	1:600
<i>Mouse-anti-PCNA</i>	Upstate Biotechnology, Temecula, USA	1:200
<i>Rabbit-anti-Claudin 1</i>	Abcam, Cambridge, UK	1:200
<i>Rabbit-anti-Cx40</i>	Biotrend, Köln	1:250
<i>Rabbit-anti-Kollagen I</i>	Abcam, Cambridge, UK	1:200
<i>Rabbit-anti-NG2</i>	Merck Millipore, Darmstadt	1:100
<i>Rabbit-anti-PDGFR-<math>\beta</math></i>	Abcam, Cambridge, UK	1:200
<i>Rabbit-anti-Prokollagen I</i>	Zur Verfügung gestellt von Juha Risteli, University of Oulu and NordLab Oulu, Oulu University Hospital, Oulu, Finnland	1:200

#### Sekundär-Antikörper:

<i>Name</i>	<i>Konjugation</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Verdünnung</i>
<i>Donkey-anti-chicken</i>	Cy2	Dianova, Hamburg	1:400
<i>Donkey-anti-goat</i>	TRITC	Dianova, Hamburg	1:400
<i>Donkey-anti-mouse</i>	Cy5	Dianova, Hamburg	1:400
<i>Donkey-anti-mouse</i>	TRITC	Dianova, Hamburg	1:400
<i>Donkey-anti-rabbit</i>	TRITC	Dianova, Hamburg	1:400

### 2.1.7 Software und Internetdienste

Diese Arbeit wurde mit Hilfe von *Microsoft Office 2013* geschrieben. Die Bearbeitung der Bilder erfolgte mit *Adobe Photoshop CS5* und *ImageJ* (Wayne Rasband, NIH, USA). Die gezeigten Graphen wurden mit *GraphPad Prism 5* erstellt. Zur Literaturrecherche diente *PubMed* von NCBI (The National Center for Biotechnology; Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Versuchstiere

#### 2.2.1.1 Generierung der Mauslinien

Für die Experimente dieser Arbeit wurden vier verschiedene Mauslinien generiert, die sich in ihren Genotypen hinsichtlich der codierenden Regionen für das Enzym Aldosteronsynthase beziehungsweise für das Gap-Junction-bildende Protein Connexin 40 unterscheiden.

Zunächst wurden zu diesem Zweck Aldosteronsynthase-defiziente Mäuse ( $AS^{-/-}$ , zur Verfügung gestellt von Prof. O. Smithies, University of North Carolina, Chapel Hill, NC, USA) mit Connexin 40-defizienten Mäusen ( $Cx40^{-/-}$ , zur Verfügung gestellt von Prof. K. Willecke, Institut für Genetik, Universität Bonn, Deutschland; ursprünglich generiert von Kirchhoff *et al.*, 1998) verpaart. Um einen einheitlichen genetischen Hintergrund zu gewährleisten, wurden im Folgenden die heterozygoten Nachkommen ( $AS^{+/-}Cx40^{+/-}$ ) untereinander verpaart. Vier der dabei erhaltenen Mauslinien ( $AS^{+/+}Cx40^{+/+}$ ,  $AS^{-/-}Cx40^{+/+}$ ,  $AS^{+/+}Cx40^{-/-}$ ,  $AS^{-/-}Cx40^{-/-}$ ) wurden anschließend in dieser Arbeit verwendet. Zur Vereinfachung werden diese in der folgenden Arbeit als Wildtyp ( $AS^{+/+}Cx40^{+/+}$ ),  $AS^{-/-}$  ( $AS^{-/-}Cx40^{+/+}$ ),  $Cx40^{-/-}$  ( $AS^{+/+}Cx40^{-/-}$ ) und  $AS^{-/-}Cx40^{-/-}$  bezeichnet.

#### 2.2.1.2 Genotypisierung der Mauslinien

Die Feststellung des Genotyps erfolgte durch PCR-Analyse genomischer DNA, welche mittels Schwanzspitzenbiopsie gewonnen wurde.

##### 2.2.1.2.1 Gewinnung genomischer DNA

Zur Gewinnung genomischer DNA wurden den zu untersuchenden Mäusen mit Hilfe einer Operationsschere 2-3 mm der äußersten Schwanzspitze steril abgetrennt. Diese wurden mit 100 µl 25 mM NaOH inkubiert (Schüttler, 1 h, 96 °C, 500 upm), anschließend gevortext und 10 µl 1 M TrisHCl (pH 8) zugegeben. Nach

Abzentrifugation der Zellbestandteile (6 min, RT, 10000 upm) konnte die gewonnene genomische DNA per PCR analysiert werden.

#### 2.2.1.2.2 PCR-Analyse genomischer DNA

Die PCR-Methode bietet die Möglichkeit in DNA-Proben die Existenz bestimmter DNA-Abschnitte qualitativ nachzuweisen. Durch Auswahl geeigneter Primer ist so eine Genotypisierung der Versuchstiere hinsichtlich gewünschter Gene möglich.

In dieser Arbeit wurde das Vorhandensein der codierenden Regionen für beziehungsweise Connexin 40 in der genomischen DNA der untersuchten Mäuse mit Hilfe folgender PCR-Ansätze überprüft:

##### Aldosteronsynthase (AS):

20 µl PCR-Reaktionsansatz	
1,0 µl	Primer (AS for.; 10 pmol/µl)
1,0 µl	Primer (AS rev.; 10 pmol/µl)
1,0 µl	Primer (eGFP; 10 pmol/µl)
2,5 µl	dNTPs (2,5 mM)
4,0 µl	Puffer (GoTaq buffer green)
0,3 µl	GoTaq-DNA-Polymerase
8,2 µl	dd H <sub>2</sub> O
2,0 µl	gDNA

Amplifizierungsprotokoll			
Zyklen	Temperatur	Dauer	Phase
1	93 °C	2 min	Aktivierung
35	93 °C	30 s	Denaturierung
	62 °C	30 s	Annealing
	72°C	2 min	Elongation
1	72°C	7 min	Elongation
1	15 °C	∞	Lagerung

##### Connexin 40 (Cx40):

20 µl PCR-Reaktionsansatz	
1,0 µl	Primer (Cx40 s; 10 pmol/µl)
1,0 µl	Primer (Cx40 as; 10 pmol/µl)
1,0 µl	Primer (WT s; 10 pmol/µl)
1,0 µl	Primer (WT as; 10 pmol/µl)
2,5 µl	dNTPs (2,5 mM)
4,0 µl	Puffer (GoTaq buffer green)
0,3 µl	GoTaq-DNA-Polymerase
7,2 µl	dd H <sub>2</sub> O
2,0 µl	gDNA

Amplifizierungsprotokoll			
Zyklen	Temperatur	Dauer	Phase
1	94 °C	3 min	Aktivierung
35	94 °C	1 min	Denaturierung
	60 °C	30 s	Annealing
	72°C	30 s	Elongation
1	72°C	5 min	Elongation
1	8 °C	∞	Lagerung

Das gewonnene PCR-Produkt wurde anschließend auf ein Agarose-Gel (1,33 % Agarose in TAE-Puffer) aufgetragen und die enthaltenen DNA-Fragmente ihrer Größe entsprechend gelelektrophoretisch bei einer Spannung von 130 V

aufgetrennt. Mit Hilfe eines mitgelaufenen 100 bp-Standards konnten die vorhandenen DNA-Fragmente bestimmt werden (AS-Wildtyp-Bande: 330 bp; AS-k.o.-Bande: 210 bp; Cx40-Wildtyp-Bande: 314 bp; Cx40-k.o.-Bande: 494 bp; s. Abb 2.1)

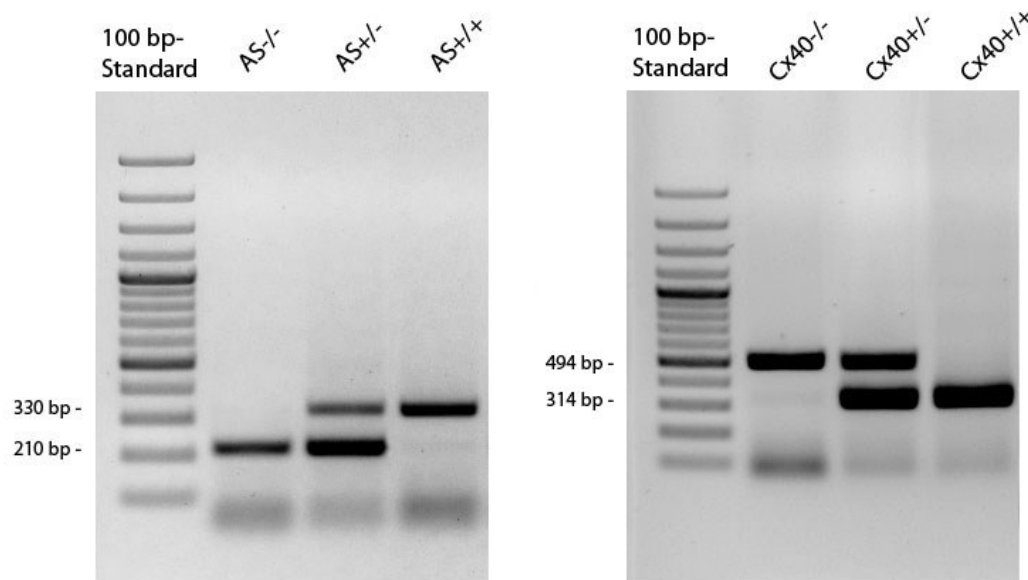


Abb. 2.1 Genotypisierungs-PCR für Aldosteronsynthase (AS, links) und Connexin 40 (Cx40, rechts)

### 2.2.1.3 Haltung der Versuchstiere

Alle Tierexperimente wurden gemäß der „*National Institutes of Health guidelines for the care and use of animals in research*“ durchgeführt und von der lokalen Ethikkommission genehmigt. Die Versuchstiere wurden bei Raumtemperatur in einem 12 h-Tag-Nacht-Rhythmus gehalten und hatten stets freien Zugang zu Futter und Wasser.

## 2.2.2. Histologische Methoden

### 2.2.2.1 Perfusions-Fixierung der Nieren

Um die zu untersuchenden Mausnieren zu konservieren, wurden diese vor ihrer Entnahme fixiert. Dies geschah durch Perfusion mit Paraformaldehydlösung. Die Wirkung von Paraformaldehyd beruht auf der reversiblen Vernetzung von Proteinen, wodurch in der Niere postmortale autokatalytische Vorgänge



verhindert werden und das Gewebe seine ursprüngliche Form beibehält. Zudem führt die Perfusions-Fixierung zu einer Härtung der Niere, was für die spätere Erstellung von dünnen Gewebeschnitten erforderlich ist.

#### 2.2.2.1.1 Retrograde arterielle Perfusions-Fixierung

Die Fixierung der Nieren adulter und juveniler Mäuse ab einem Alter von vier Wochen erfolgte durch retrograde arterielle Perfusion. Die zu untersuchenden Mäuse wurden dazu mit einer Kombination aus Ketamin (43,1 mg/ml) und Xylazin (2,8 mg/ml) anästhesiert und in Rückenlage fixiert. Nach dem Öffnen der Bauchdecke wurde die *Aorta abdominalis* mit Hilfe einer Pinzette freigelegt und unterhalb des Abgangs der *Aorta renalis* abgeklemmt. Distal zur Klemme wurde die *Aorta abdominalis* mittels einer Augenschere geöffnet und ein Perfusionskatheter mit Hilfe eines Gefäßdilators eingeführt. Nach Entfernen der Klemme und Öffnen der *Vena cava* zum Druckausgleich erfolgte bei konstantem Perfusionsfluss (40 ml/3 min) die retrograde Perfusion von 20 ml Ringerlösung (+ 2 µl/ml Heparin). Im Anschluss daran wurde zur Fixierung der Organe mit 40 ml frisch angesetztem 3 % Paraformaldehyd in PBS (pH 7,4) perfundiert (sollte in den Nieren die Bindung von anti-AKR1B7-Antikörpern nachgewiesen werden, erfolgte die Perfusion stattdessen mit Boin-Fixier-Lösung). Daraufhin wurden die fixierten Nieren entnommen und bis zur weiteren Behandlung in 70 % Methanol bei 8 °C aufbewahrt. Falls eine der beiden Nieren zur Untersuchung der renalen mRNA (s. 2.2.4.1-2.2.4.4) verwendet werden sollte, wurde nur die rechte Niere perfundiert, während die linke mit Hilfe einer Ligatur der zuführenden *Aorta renalis* von der Perfusion abgetrennt wurde. Die unperfundierte linke Niere wurde direkt in flüssigen Stickstoff überführt und anschließend bei -80 °C bis zur weiteren Untersuchung gelagert.

#### 2.2.2.1.2 Perfusions-Fixierung über linken Herzventrikel

Bei Mäusen im Alter von unter vier Wochen war aufgrund der anatomischen Gegebenheiten eine arterielle Perfusion nur schwer möglich. Daher erfolgte bei diesen Tieren die Perfusion über den linken Herzventrikel. Zu diesem Zweck wurde der Perfusionskatheter durch eine Einmal-Kanüle (25 G) ersetzt und nach

Freilegung des Herzens und einem Schnitt in die Leber zum Druckausgleich, direkt über den linken Herzventrikel mit konstantem Perfusionsdruck perfundiert - der Körpergröße der Mäuse angepasst zunächst mit 10 ml Ringerlösung und anschließend mit 20 ml frisch angesetztem 3 % Paraformaldehyd in PBS (pH 7,4). Die fixierten Nieren wurden entnommen und bis zur weiteren Behandlung in 70 % Methanol bei 8 °C aufbewahrt.

#### 2.2.2.2 Einbettung fixierter Nieren in Paraffin

Vor der Einbettung in Paraffin wurden die fixierten Nieren zunächst in Gewebe-Einbettkassetten gegeben und mit Hilfe einer Methanolreihe ansteigender Konzentration (2 x 70 %, 2 x 80 %, 2 x 90 %, 2 x 100 %; jeweils 30 min) schrittweise dehydriert. Daraufhin wurden die Nieren dreimal für 30 min in 100 % Isopropanol gegeben. Das dritte Isopropanolbad besaß dabei eine Temperatur von 45 °C. Anschließend folgten 30 min bei 55 °C in einem Isopropanol-Paraffin-Gemisch (1:1), bevor die Nieren zuletzt für 2 x 24 h in flüssigem Paraffin (60 °C) inkubiert wurden. Abschließend wurden die Nieren mit Hilfe von Silikon-Kautschuk-Einbettformen in 60 °C warmes Paraffin eingebettet. Die Abkühlung und Härtung erfolgte im Wasserbad bei Raumtemperatur innerhalb weniger Stunden.

#### 2.2.2.3 Anfertigung von Paraffinschnitten

Die Paraffinblöcke mit den darin eingebetteten Nieren wurden auf Holzblöcke geklebt und mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms Schnitte von 5 µm Dicke erstellt. Diese wurden in einem 40 °C warmen Wasserbad gestreckt, auf Objektträger aufgezogen und daraufhin bei 39 °C über Nacht im Wärmeschrank getrocknet. Vor den anschließenden Färbungen erfolgte eine Entparaffinierung der Schnitte in Xylol (2 x 15 min 100 % Xylol) und Isopropanol (2 x 5 min 100 %, 1 x 5 min 96 %, 1 x 5 min 80 %, 1 x 5 min 70 % Isopropanol).

#### 2.2.2.4 Immunhistochemische Färbung

In der Immunhistochemie nutzt man spezifische Antikörper um das Verteilungsmuster einzelner Proteine sichtbar zu machen. Zunächst wird der Gewebeschnitt mit einem primären Antikörper inkubiert, der spezifisch an ein Epitop des zu untersuchenden Proteins bindet. Daraufhin wird dieser Antikörper von einem sekundären Antikörper erkannt. Dieser ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, der durch Anregung mit Licht geeigneter Wellenlänge unter dem Mikroskop sichtbar gemacht werden kann.

Die Antikörperfärbung erfolgte nach vollständiger Entparaffinierung der Schnitte abhängig vom verwendeten Antikörper nach einem der folgenden Protokolle:

##### Protokoll 1 (Aldoketoreduktase 1B7, Claudin 1, Glattmuskelaktin, Renin, Sm22):

- 3 x 5 min waschen in PBS-Otto-Puffer auf dem Schüttler
- 20 min blockieren mit 10 % HS und 1 % BSA in PBS-Otto (Abschwächung unspezifischer Bindungen)
- Inkubation mit 1. Antikörper (verdünnt in 1 % BSA in PBS-Otto) über Nacht bei 8 °C in einer geschlossenen, feuchten Kammer
- 3 x 5 min waschen mit 1 % BSA in PBS-Otto
- Inkubation mit 2. Antikörper (verdünnt in 1 % BSA in PBS-Otto) für 1,5 h im Dunkeln
- 3 x 5 min waschen in PBS-Otto im Dunkeln
- Eindeckeln mit Glycergel

##### Protokoll 2 (Connexin 40, Kollagen I, NG2, PDGF-Rezeptor- $\beta$ , Prokollagen I, Renin):

- 1 x 5 min waschen in PBS-Otto-Puffer auf dem Schüttler
- 1 x 5 min waschen in H<sub>2</sub>O auf dem Schüttler
- 45 min in Tris/EDTA bei 95 °C im Wasserbad
- 30 min auf Raumtemperatur abkühlen lassen
- 2 h blockieren mit 5 % HS und 0,3 % Triton X-100 in PBS (Abschwächung unspezifischer Bindungen)
- 2 x 5 min waschen in PBS-Otto auf dem Schüttler

- Inkubation mit 1. Antikörper (verdünnt in Blockierlösung) über Nacht bei 8 °C in einer geschlossenen, feuchten Kammer
- 3 x 5 min waschen in PBS-Otto
- Inkubation mit 2. Antikörper (verdünnt in Blockierlösung) für 1,5 h im Dunkeln
- 2 x 5 min waschen in PBS-Otto im Dunkeln
- 1 x 5 min waschen in H<sub>2</sub>O
- Eindeckeln mit Glycergel

### 2.2.3. Mikroskopie

#### 2.2.3.1 Lichtmikroskopie

Die Untersuchung und Digitalisierung der immunfluoreszent gefärbten Schnitte erfolgte mit Hilfe eines Axiovert200M-Mikroskops mit motorisierter Objektauflage, einer Schwarz-Weiß-CCD-Kamera (AxioCam MRm) sowie der Software *AxioVision Rel.4.9* von Zeiss. Die Farbstoffe der verwendeten sekundären Antikörper wurden unter Zuhilfenahme passender Fluoreszenzfilter angeregt und das entstandene Emissionslicht im jeweiligen Spektralbereich aufgenommen (Cy2: Anregung bei 450-490 nm, Emission bei 500-550 nm; TRITC: Anregung bei 533-558 nm, Emission bei 570-640 nm; Cy5: Anregung bei 625-655 nm, Emission bei 665-715 nm). Die drei erhaltenen Bilder wurden nachträglich mit der Software *AxioVision Rel.4.9* überlagert und im Rot-Grün-Blau (RGB)-Farbraum gespeichert.

#### Ausmessung der Fläche Renin-positiver Zellen pro Glomerulus:

Mit Hilfe des Programms ImageJ wurden auf Übersichtsaufnahmen von Renin-gefärbten Nierenschnitten (Vergrößerung: 100-fach) die Flächen der zusammenhängenden Renin-positiven Bereiche an einzelnen Glomeruli ausgemessen (1 px  $\triangleq$  1,04  $\mu\text{m}^2$ ). Aus jeweils 50 Messungen wurde die durchschnittliche Fläche berechnet.

### 2.2.3.2 Konfokale Mikroskopie

Im Gegensatz zur konventionellen Lichtmikroskopie wird bei der Verwendung eines konfokalen Mikroskops das Präparat nicht von einem Lichtstrahl zur Gänze beleuchtet, sondern mit Hilfe eines fokussierten Lichtpunkts zeilenweise abgetastet. Zudem befindet sich in konfokalen Mikroskopen eine zusätzliche Blende ("Pinhole"), die Licht, das ober- und unterhalb der Fokusebene entsteht, ausblendet bevor dieses den Detektor erreicht. Auf diese Weise wird nur Licht aus einer klar abgegrenzten Fokusebene detektiert und Streulicht aus umliegenden Bereichen minimiert. Dadurch entsteht eine sehr gute Auflösung in Z-Richtung, die das Erstellen von optischen Schnitten ermöglicht.

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Carl Zeiss LSM710-Mikroskop handelte es sich um ein konfokales Laser Scanning-Mikroskop, bei dem das Präparat, wie der Name sagt, mit Hilfe eines fokussierten Laserstrahls abgerastert wird. Über ein bewegliches Spiegelsystem wurde der Laser über die immunhistochemisch behandelten Nierenschnitte gefahren und dabei entstandenes Fluoreszenzlicht von einem Detektor aufgefangen und an einen Computer weitergeleitet. Hier erfolgte die Verarbeitung der Daten mittels der Software *Zeiss ZEN 2012*. Zur Anregung der Fluoreszenz dienten Laser der Wellenlänge 458 nm (Cy2), 561 nm (TRITC) und 633 nm (Cy5).

### 2.2.3.3 Transmissionselektronenmikroskopie

Für die Transmissionselektronenmikroskopie wurden die Nieren bei konstantem Druck (90 mmHg) für 3 min mit Fixierlösung (2 % Glutaraldehyd in PBS) perfundiert. Daraufhin wurde die Niere mit einer Rasierklinge in zwei Hälften geteilt und bis zur Einbettung in der Fixierlösung bei 4 °C aufbewahrt.

Die Nierenhälften wurden anschließend in ca. 1 mm<sup>3</sup> große Blöcke geschnitten und mit Hilfe einer automatischen Mikrowelle in Epon eingebettet. Unter Zuhilfenahme eines Ultra-Mikrotoms wurden dann 70 nm dicke Schnitte des Nierengewebes hergestellt, die auf Pioloform-beschichtete Kupfer-Netze übertragen wurden. Die Schnitte wurden nun unter Verwendung einer 4 %-igen Uranylacetatlösung und einer 0,5 %-igen Bleicitratlösung kontrastiert.

Für die Akquisition der elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde ein Phillips CM12 Transmissionselektronenmikroskop mit einer LaB<sub>6</sub>-Kathode als Elektronenquelle und einer Beschleunigungsspannung von 120 keV verwendet. Die Digitalisierung der Aufnahmen erfolgte mit einer TEM-1000 Slow-Scan-CCD-Kamera (TVIPS-Tietz GmbH) unter Verwendung des Programms *EM-Menu 4.0*.

## 2.2.4. Molekularbiologische Methoden

### 2.2.4.1 Isolierung renaler RNA

Die Methode der RNA-Isolierung aus Nieren basiert auf dem Guanidinium-Phenol-Chloroform-Protokoll von Chomczynski und Sacchi (1987). Zunächst wurde das Nierengewebe in Trizol-Reagenz homogenisiert. Trizol ist eine einphasige Lösung, die Phenol und Guanidinisoithiocyanat beinhaltet. Mit Hilfe von Chloroform folgte die Auftrennung des Homogenisats in drei Phasen. Die RNA wurde anschließend mit Isopropanol aus der wässrigen Phase gefällt.

Bei jedem Arbeitsschritt wurden zur Vermeidung von RNase-Kontamination Latex-Handschuhe getragen. Soweit möglich wurden RNase-freie Einmal-Artikel und -Geräte verwendet. Alle Puffer und Lösungen wurden mit Diethylenpyrocarbonat (DEPC)-behandeltem Wasser angesetzt und sämtliche Arbeitsschritte, falls nicht anders angegeben, auf Eis durchgeführt.

#### Protokoll zur RNA-Isolierung

- 1 ml TRISure (Trizol)-Reagenz für ½ adulte Mausniere in 12 ml-Sarstedt-Tubes auf Eis vorlegen
- Nieren direkt aus flüssigem Stickstoff in das Röhrchen überführen und ca. 30 s mit einem Ultra-Turrax-Mixer homogenisieren
- Mix in 2 ml Eppendorf-Cups überführen und 5 min bei Raumtemperatur stehen lassen (Proteine denaturieren und lösen sich in Phenol)
- 200 µl Chloroform zugeben; schütteln (nicht vortexen)
- 20 min bei 4 °C und 12000 upm zentrifugieren

- ca. 500 µl wässrigen Überstand in 1,5 ml Eppendorf-Cup überführen; dabei auf keinen Fall Interphase mitnehmen (unten rote Phenolphase - dazwischen Interphase mit hydrophilen Proteinen)
- wässrige Phase 1:1 (500 µl) mit Isopropanol mischen und kräftig schütteln
- 10 min bei Raumtemperatur stehen lassen (Ausfällung der RNA)
- 10 min bei 4 °C und 12000 upm zentrifugieren; Überstand verwerfen
- Pellet in 1 ml 75 % Ethanol aufnehmen
- 5 min bei 4 °C und 7500 upm zentrifugieren; Überstand abkippen
- Pellet 10 min bei Raumtemperatur trocknen lassen und je nach Größe in 100-300 µl RNase-freiem Wasser lösen
- max. 2 min bei 65 °C im Schüttler resuspendieren; bei -80 °C lagern

#### 2.2.4.2 RNA-Quantifizierung

Die Konzentration der isolierten RNA wurde mit Hilfe eines Photometers bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Aus dem Quotienten der optischen Dichte bei beiden Wellenlängen wurde die Qualität der isolierten RNA ermittelt. Für die Versuche wurde nur RNA mit einem Quotienten zwischen 1,5 und 2,0 verwendet.

#### 2.2.4.3 cDNA-Synthese

Die isolierte RNA wurde im nächsten Schritt mittels reverser Transkription in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Um dabei nur mRNA-Moleküle zu transkribieren, wurden Oligo (dT)<sub>15</sub>-Primer verwendet, welche selektiv an den 3'-poly(A)-Schwanz der renalen mRNA binden.

1 µg der Ausgangs-RNA wurde mit 1 µl Oligo (dT)<sub>15</sub>-Primer vermengt und der Ansatz mit H<sub>2</sub>O auf 10 µl aufgefüllt. Nach 5 min bei 65 °C wurde der Ansatz auf Eis gestellt und ein Mix aus 1 µl M-MLV-Reverse Transkriptase, 1 µl dNTPs, 4 µl Puffer (5 x First Strand Buffer, Invitrogen) und 3 µl H<sub>2</sub>O zugegeben. Die cDNA-Synthese erfolgte während 1 h bei 37 °C. Abschließend wurde der Ansatz zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase für 2 min auf 96 °C erhitzt. Vor der weiteren Analyse mittels quantitativer Echtzeit-PCR wurde die erhaltene cDNA mit 30 µl H<sub>2</sub>O verdünnt und bei -20 °C gelagert.

#### 2.2.4.4 Quantitative Echtzeit-PCR

Mit Hilfe der quantitativen Echtzeit-PCR (qPCR) ist es möglich, DNA zu vervielfältigen und gleichzeitig Auskunft über die Menge der amplifizierten DNA zu erhalten. Dies geschieht durch einen Fluoreszenzfarbstoff (hier: SYBRGreen), der sich während jedem Vervielfältigungsschritt an die neu gebildete doppelsträngige DNA anlagert. Das Signal des Farbstoffs wird nach jedem Zyklus neu gemessen und korreliert quantitativ mit der Menge an gebildetem PCR-Produkt.

Um die quantitative Echtzeit-PCR durchzuführen wurde das Lightcycler 480® SYBR Green I Master Kit und ein Roche Lightcycler LC480 genutzt. Zum Ausgangsmaterial von 1 µl cDNA wurden 5 µl QuantiTect SYBR® Green PCR Mastermix sowie je 0,5 µl des *sense*- und *antisense*-Primers (je 10 pmol) und 3 µl H<sub>2</sub>O gegeben. Auf eine Aktivierungsphase (15 min bei 95 °C) folgten 40 Zyklen, bestehend aus Denaturierungsphase (15 s bei 95 °C), Annealingphase (20 s bei 58 °C) und Elongationsphase (20 s bei 72 °C). Am Ende jedes Zyklus erfolgte die Fluoreszenzmessung. Um das Schmelzverhalten der amplifizierten DNA zu analysieren, wurde nach Ablauf des Amplifikationsprogrammes die DNA langsam (0,1 °C/s) von 60 °C auf 95 °C erhitzt und dabei die Fluoreszenz kontinuierlich gemessen. Als Haushaltsgen diente GAPDH.

#### 2.2.4.5 Bestimmung der Plasma-Renin-Konzentration

Zur Bestimmung der Plasma-Renin-Konzentration wurde die von Renin katalysierte Reaktion betrachtet, bei welcher Angiotensin I aus Angiotensinogen gebildet wird. Die zu untersuchenden Plasmaproben wurden dazu zusammen mit Reninsubstrat (Angiotensinogen im Plasma von beidseitig nephrektomierten Ratten) inkubiert. Die Menge an entstandenem Angiotensin I war proportional zum Renin-Gehalt der untersuchten Probe. Sie wurde mit Hilfe eines Radioimmunoassay-Kits (RIA) der Firma DiaSorin mit den vom Hersteller bereitgestellten Reagenzien und Standards bestimmt.

Als Proben diente aus Vollblut mittels Hämatokritzentrifuge (4 min, 12000 upm) abgetrenntes Blutplasma. Die Blutentnahme bei den Versuchstieren erfolgte durch Punktion der *Vena facialis*.



Die zu vermessende Plasmaprobe wurde nach erwarteter Plasmareninmenge (1:10 – 1:2000), das Reninsubstrat 1:5 mit Maleatpuffer verdünnt. Nun wurden 50 µl verdünnte Probe, 50 µl Mix aus 4 Teilen verdünntem Reninsubstrat und 5 Teilen RIA-Reaktionspuffer (Kit), sowie 2 µl Enzyminhibitor (PMSF, Kit) vermengt. Von diesem Mix wurde jeweils eine Hälfte bei 37 °C und die andere bei 4 °C 90 min lang inkubiert. Anschließend wurden jeweils 45 µl mit 500 µl Tracer (Kit) in RIA-Röhrchen (Kit) überführt und diese zusammen mit 5 Standardproben (Kit) 3-24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Inkubationsphase binden proportional zur vorhandenen Konzentration Angiotensin I-Moleküle an die mit anti-Angiotensin I-Antikörpern beschichtete Innenseite der RIA-Röhrchen. An die übrigen Bindestellen binden sich kompetitiv die radioaktiven Tracermoleküle. Anschließend wurde die Radioaktivität der Röhrchen gemessen, und anhand einer aus den Standardwerten gebildeten Kurve die Angiotensin I-Konzentration in den Proben bestimmt.

#### 2.2.5. Isoliert perfundierte Niere

Die Methode der isoliert perfundierten Niere, die nach dem Protokoll von Schweda *et al.*, (2003) durchgeführt wurde, bietet die Möglichkeit, den Einfluss verschiedener Parameter auf die Sekretion von Renin *in vivo* zu untersuchen.

Die Mausniere wurde dazu *ex situ* in einer speziellen Wärmeschale über die Nierenarterie perfundiert. Die Ableitung des Perfusats erfolgte über eine Kanulierung der renalen Vene. Als Basislösung für die Perfusion der Niere wurde eine modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung verwendet, welche mit Rinderserum-Albumin (6 g/100 ml) und humanen roten Blutkörperchen (10 % Hämatokrit) versetzt war. Über eine stufenweise Erhöhung wurde der Einfluss des Perfusionsdrucks auf die Renin-Sekretion in der isoliert perfundierten Niere überprüft. Weiterhin konnten Veränderungen der Renin-Sekretion als Reaktion auf Zugabe von Isoproterenol, Angiotensin II oder Ethylenglycol-144 Tetraacetat (EGTA) untersucht werden. Zur Beurteilung der Renin-Sekretionsrate wurden alle 2 min Proben des venösen Abflusses gesammelt und die Renin-Aktivität im Probenvolumen anschließend mittels Radioimmunoassay (s. 2.2.4.5) bestimmt.

Unter der Renin-Sekretionsrate versteht die Renin-Aktivität ( $\text{ng}_{\text{ANG I}}/\text{ml}\cdot\text{h}^{-1}$  des Perfusats multipliziert mit dem Perfusatfluss ( $\text{ml}/\text{g}_{\text{Organgewicht}}\cdot\text{min}^{-1}$ ).

### 2.2.6 Blutdruckmessung

Die Messung des Blutdrucks erfolgte nicht-invasiv mittels einer Blutdruckmanschette am Schwanz der Mäuse (Non-Invasive Blood Pressure Monitoring System, TSE Systems, Bad Homburg). Zunächst wurden die zu untersuchenden Mäuse während einer Eingewöhnungsperiode von sieben aufeinanderfolgenden Tagen für 15 min/d in die vorgewärmte Haltevorrichtung platziert. Anschließend erfolgte die Blutdruckmessung an 10 verschiedenen Tagen.

### 2.2.7 Statistik

Für statistische Vergleiche mehrerer verschiedener Gruppen wurde die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließender Bonferroni-Reduktion angewendet. Für Einzelvergleiche wurde der Student's *t*-Test durchgeführt. Die Irrtumswahrscheinlichkeit *p* wurde bei  $p < 0,05$  als statistisch signifikant betrachtet.

## 3. Ergebnisse

Renin-produzierende Zellen der Niere finden sich klassischer Weise in der *Media* afferenter Arteriolen an juxtaglomerulärer Position. Sie ersetzen hier die glatten Gefäßmuskelzellen und bilden gemeinsam mit *Macula densa* und extraglomerulärem Mesangium den juxtaglomerulären Apparat. Es konnte bereits vielfach gezeigt werden, dass eine Stimulation des RAAS zu einer Vermehrung Renin-produzierender Zellen in der Niere führt (Gomez *et al.*, 1990; Sequeira-Lopez *et al.*, 2004). Einen besonders starken Stimulus stellt hierbei die Abwesenheit des RAAS-Effektorhormons Aldosteron dar. Aldosteronsynthase-defiziente (AS<sup>-/-</sup>) Mäuse zeigen eine massive kompensatorische Überproduktion Renin-bildender Zellen im juxtaglomerulären Bereich (Makhanova *et al.*, 2005).

Diese Arbeit dient der Charakterisierung der Renin-produzierenden Zellen in AS<sup>-/-</sup>-Mäusen. Im ersten Teil der Arbeit (3.1) wurden die strukturellen und funktionellen Eigenschaften dieser Zellen analysiert. Im zweiten Teil (3.2) wurde anhand von AS-Cx40-Doppelknockout-Mäusen untersucht, inwiefern die Abwesenheit des Gap-Junction-bildenden Proteins Connexin 40 die Eigenschaften der Zellen beeinflusst.

## 3.1 Charakterisierung Renin-produzierender Zellen der AS<sup>-/-</sup>-Maus

### 3.1.1 Lokalisation und Morphologie

#### 3.1.1.1 Lokalisation

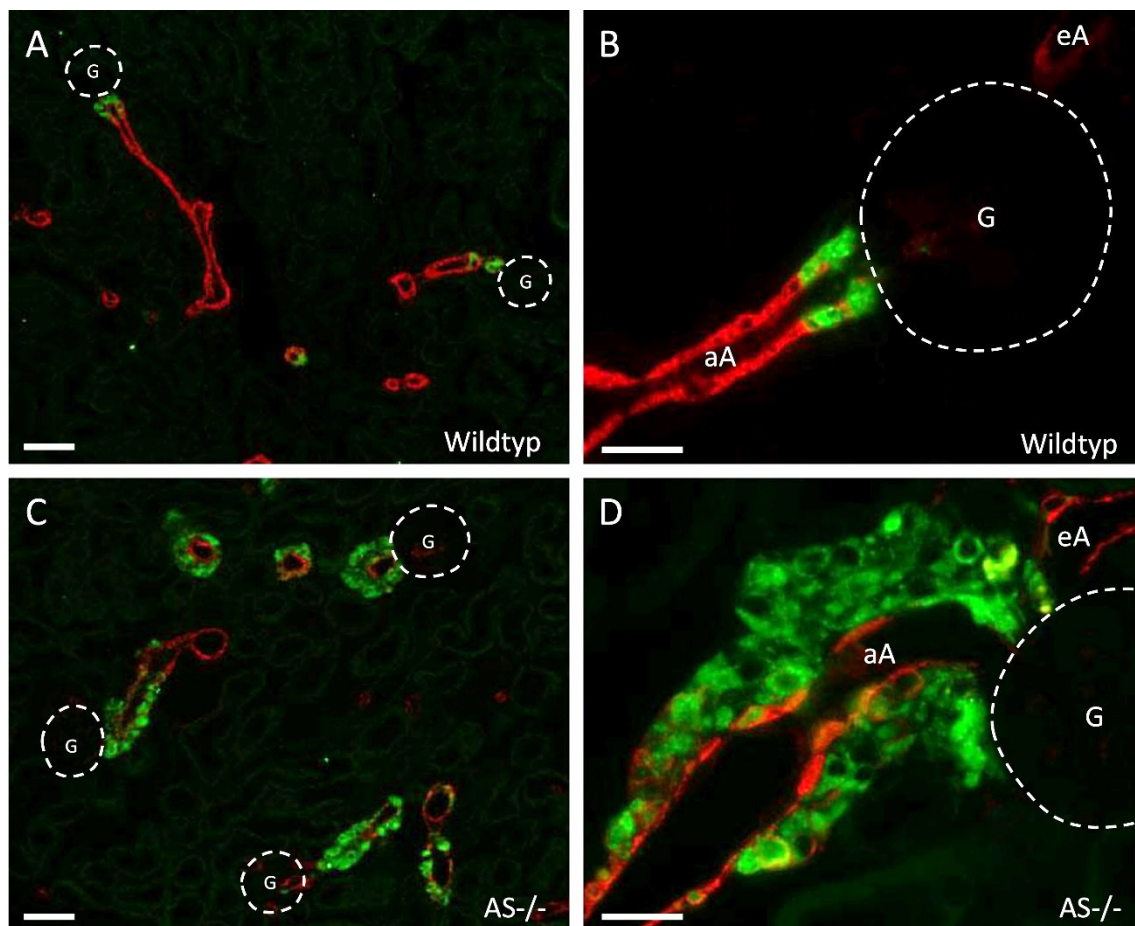
Um die Lokalisation Renin-produzierender Zellen in AS<sup>-/-</sup>-Mäusen zu analysieren, wurden Nierenschnitte 10 Wochen alter AS<sup>-/-</sup>-Mäuse immunhistochemisch gefärbt. Mit Hilfe Renin-spezifischer Antikörper konnten hierbei Renin-bildende Zellen sichtbar gemacht werden. Um den Gefäßbaum der Niere zu zeigen, wurde zudem ein Glattmuskelaktin-spezifischer Antikörper eingesetzt. Als Kontrolle dienten Nieren gleichaltriger Wildtyp-Mäuse.

Die hier untersuchten Aldosteronsynthase-defizienten Mäuse zeigten im Verhältnis zum Wildtyp eine starke Zunahme der Anzahl Renin-positiver Zellen (s. Abb. 3.1). Zusätzlich zu den Reninzellen an typischer juxtaglomerulärer Position fanden sich auch Reninzellen weiter entfernt vom Glomerulus in der *Media* der

afferenten Arteriole. Vereinzelt zeigten sich Renin-positive Zellen auch in der Gefäßwand der *Interlobular*-Arterien.

Zusätzlich zu diesen vaskulären Zellen traten in  $AS^{-/-}$ -Mäusen weitere Renin-positive Zellen auf, welche nicht in der Gefäßwand lagen, sondern in mehreren Schichten manschettenartig um die präglomerulären Gefäße angeordnet waren. Diese Zellen bildeten ein zusammenhängendes Reninzellfeld welches vom vaskulären Pol der Glomeruli ausgehend die afferente Arteriole - teilweise über ihre gesamte Länge bis hin zur Abzweigung zur *Interlobular*-Arterie - umschloss.

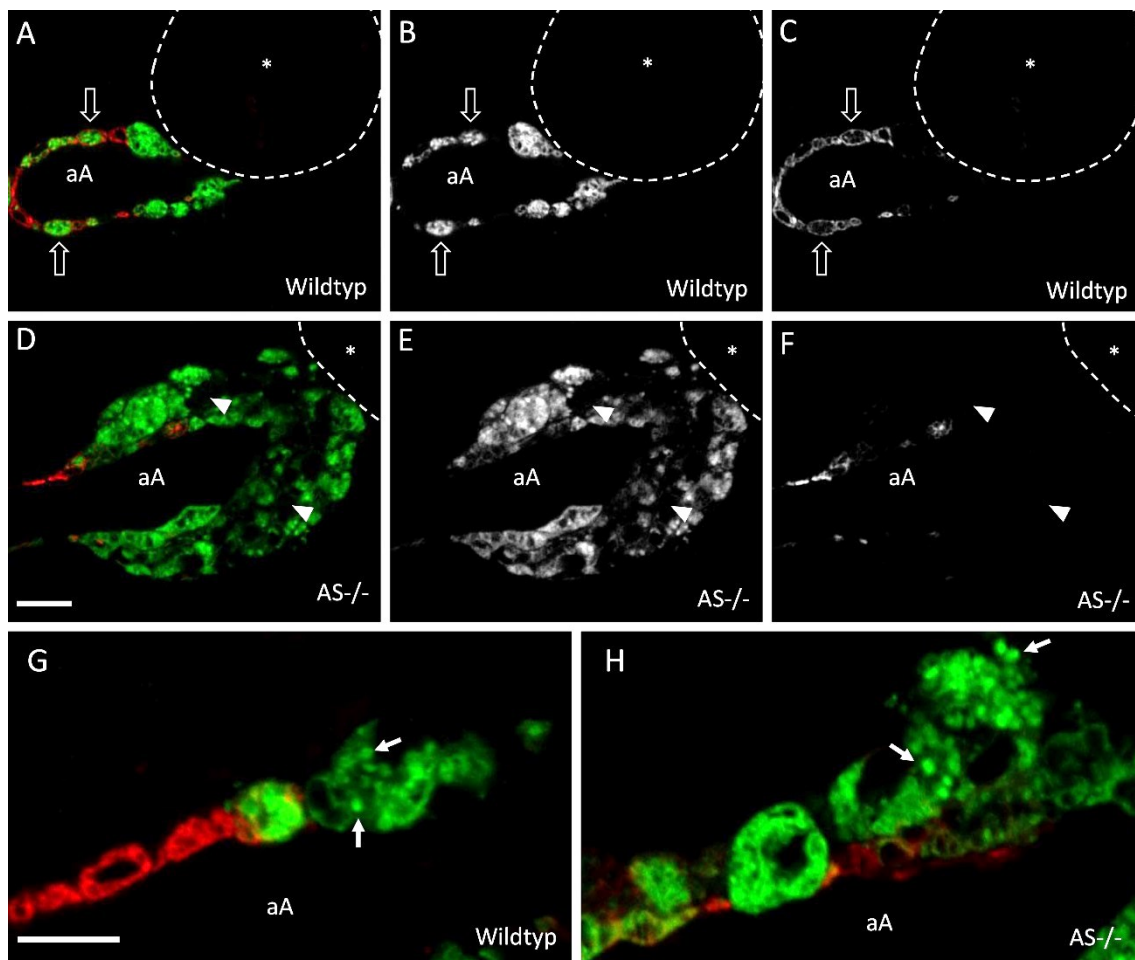
In den zum Vergleich untersuchten Wildtyp-Nieren fanden sich Renin-positive Zellen ausschließlich an klassischer juxtaglomerulärer Position in der *Media* der afferenten Arteriole (s. Abb. 3.1 A und B).



**Abb. 3.1:** Immunfluoreszenzfärbung für Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot) im Nierenkortex von Wildtyp- und  $AS^{-/-}$ -Mäusen. A und B zeigen den Nierenkortex einer Wildtyp-Maus in 100-facher (A) und 400-facher (B) Vergrößerung. C und D zeigen den Nierenkortex einer  $AS^{-/-}$ -Maus in 100-facher (C) und 400-facher (D) Vergrößerung. aA: Afferente Arteriole; eA: Efferente Arteriole; G: Glomerulus; Maßstabsbalken: 50  $\mu$ m (A und C); 20  $\mu$ m (B und D);

### 3.1.1.2 Morphologie

In der Wildtyp-Niere können die *Media*-Zellen der afferenten Arteriole in drei verschiedenen Zustandsformen auftreten. Direkt am Gefäßpol zeigt sich der sekretorische Zelltyp, der mit Renin-positiven Vesikeln und einer kuboiden Form eine ausdifferenzierte Renin-produzierende Zelle darstellt. Weiter entfernt vom Glomerulus findet man den kontraktile Zelltyp, der keine Vesikel besitzt und mit einer eher länglichen, spindelförmigen Form und kontraktilem Elementen die Eigenschaften einer glatten Gefäßmuskelzelle zeigt. Räumlich zwischen diesen beiden Zelltypen liegen sogenannte Intermediärzellen, die sowohl Renin-positive Vesikel als auch kontraktile Elemente aufweisen (Taugner und Hackenthal, 1989).

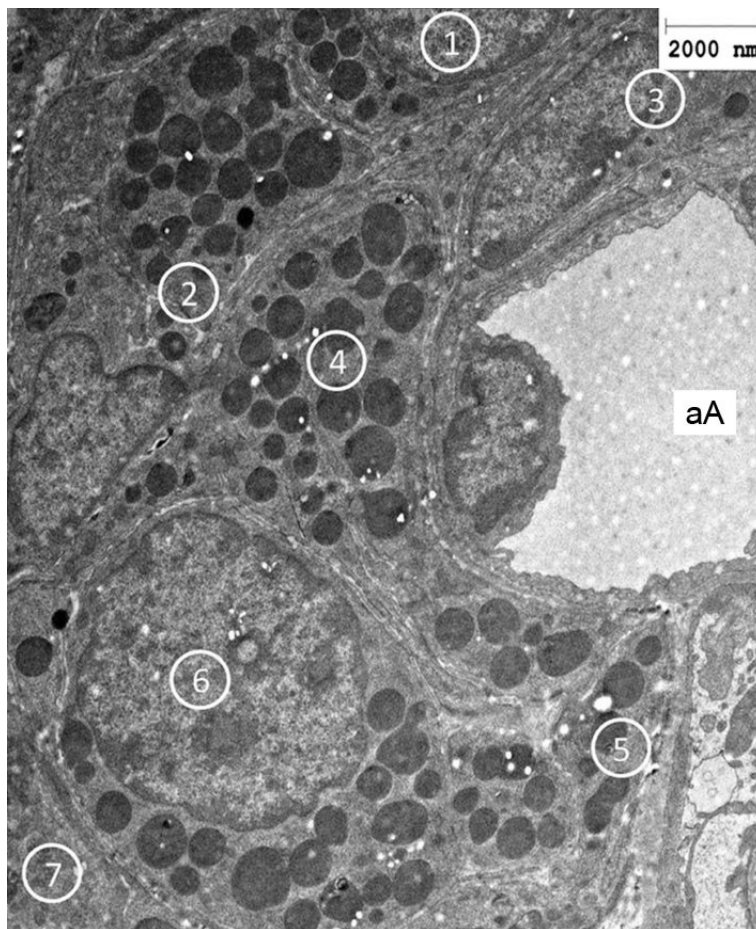


**Abb. 3.2:** Konfokalmikroskopische Aufnahmen der afferenten Arteriole von Wildtyp (A-C; G) und AS<sup>-/-</sup>-Mäusen (D-F; H). Dargestellt ist die immunhistochemische Färbung von Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot). Bild B und E zeigen Renin-Fluoreszenz allein. Bild C und F zeigen Glattmuskelaktin-Fluoreszenz allein. Die übrigen Bilder zeigen eine Überlagerung von Renin- und Glattmuskelaktin-Fluoreszenz. Leere Pfeile: Intermediärzellen im Wildtyp; Pfeilspitzen: Renin-arme perivaskuläre Zellen in AS<sup>-/-</sup>; Pfeile: Renin-positive Vesikel; aA: Afferente Arteriole; (\*): Glomerulus; Maßstabsbalken: 10 µm;



Konfokalmikroskopische Untersuchungen, bei denen mit Glattmuskelaktin und Renin angefärbte Nierenschnitte 10 Wochen alter Mäuse betrachtet wurden, sollten klären, ob es sich bei den Zellen der perivaskulären Zellfelder der AS<sup>-/-</sup>-Mäuse um vollständig ausdifferenzierte Renin-produzierende Zellen handelte.

Wie Abbildung 3.2 zeigt, unterschieden sich die Reninzellen der AS<sup>-/-</sup>-Mäuse, die außerhalb der Gefäßwand lokalisiert waren, in ihrer Morphologie nicht von den klassischen juxtaglomerulären Reninzellen der Wildtyp-Tiere. Wie diese waren sie dicht bepackt mit Renin-positiven Vesikeln und zeigten eine damit einhergehende Volumenvergrößerung und kuboide Form (s. Abb. 3.2 G und H). Dies bestätigte auch eine elektronenmikroskopische Untersuchung der perivaskulären Reninzellen (s. Abb. 3.3). Glattmuskelaktin, das sich in der glatten Muskulatur sowie in den vaskulären Intermediärzellen zeigte, fand sich in diesen Zellen nicht oder nur zu einem sehr geringen Anteil (s. Abb. 3.2 F).



**Abb. 3.3:** Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Querschnitts durch eine afferente Arteriole einer AS<sup>-/-</sup>-Maus. Es sind sieben Zellen (1-7) zu erkennen, die elektronendichte Renin-Speichervesikel beinhalten und mehrlagig um das Lumen der afferenten Arteriole (aA) angeordnet sind.

Der Gehalt an Renin war nicht in allen perivaskulären Zellen gleich groß. So fanden sich innerhalb der Reninzellfelder zwischen stark Renin-gefärbten Zellen auch solche mit relativ schwachem Renin-Signal (exemplarische Zellen sind in Abb. 3.2 D-F durch Pfeilspitzen gekennzeichnet). In diesen Zellen ging mit der geringeren Renin-Produktion allerdings keine Zunahme an Glattmuskelaktin einher, wie es typischerweise in den vaskulären Intermediärzellen der Wildtyp-Mäuse der Fall ist (exemplarische Intermediärzellen im Wildtyp sind in Abb. 3.2 A-C durch leere Pfeile gekennzeichnet).

### 3.1.1.3 Altersabhängige Veränderungen

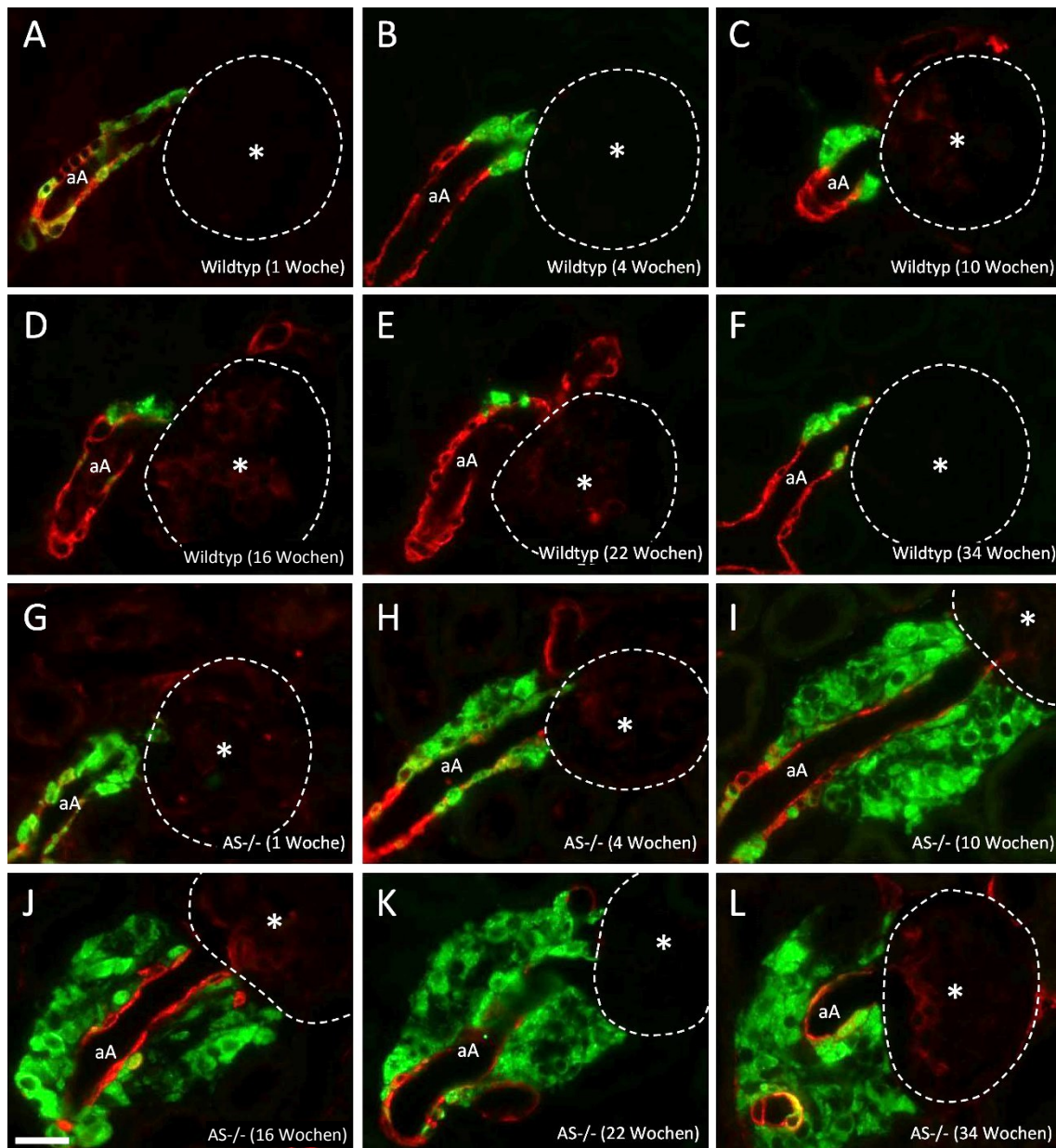
#### 3.1.1.3.1 Veränderungen der Reninzell-Anzahl

Die Anzahl der Renin-produzierenden Zellen in der Wildtyp-Niere unterliegt einem starken Wandel. Sie nimmt während der Embryonalentwicklung der Niere zunächst stark zu und fällt dann postpartal wieder ab. Etwa vier Wochen nach der Geburt ist die Entwicklung der Niere vollständig abgeschlossen und die Zahl der Reninzellen, die sich an den einzelnen Glomeruli finden, erreicht einen konstanten Wert (Machura *et al.*, 2007).

Eine Analyse der Nierenschnitte unterschiedlich alter Tiere sollte Aufschluss darüber geben, ob bzw. wie sich die Anzahl der Renin-bildenden Zellen in adulten AS<sup>-/-</sup>-Mäusen mit zunehmendem Alter verändert. Zu diesem Zweck wurden die Nieren von 1, 4, 10, 16, 22 und 34 Wochen alten AS<sup>-/-</sup>-Mäusen untersucht und diese lichtmikroskopisch in Hinblick auf die Anzahl Renin-positiver Zellen pro Glomerulus verglichen. Als Kontrolle dienten Wildtyp-Mäuse gleichen Alters.

Es konnte festgestellt werden, dass die Zahl der Renin-positiven Zellen pro Glomerulus in den Aldosteronsynthese-defizienten Mäusen während der ersten Lebensmonate stetig zunahm (s. Abb. 3.4 G-L). Im Alter von einer Woche war die Anzahl der Reninzellen im Vergleich zu gleich alten Wildtyp-Tieren noch nicht deutlich erhöht (s. Abb. 3.4 A und G). Ein Großteil der Reninzellen befand sich in diesem Altersstadium in der Wand der präglomerulären Gefäße. Nur wenige Reninzellen fanden sich dagegen in perivaskulärer Position. Dies änderte sich mit zunehmendem Alter.





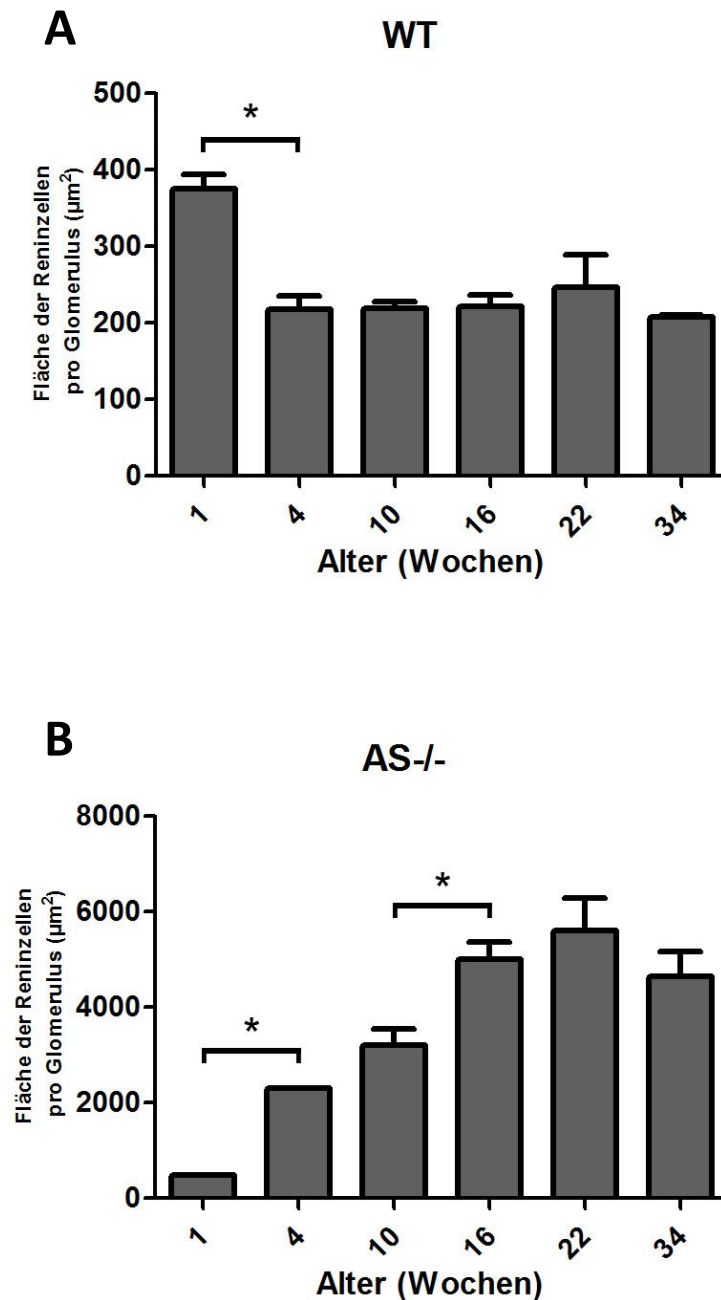
**Abb. 3.4: Altersabhängige Veränderungen der Anzahl Renin-produzierender Zellen in Wildtyp- und  $AS^{-/-}$ -Niere.** Dargestellt ist die immunhistochemische Färbung von Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot). A-F: Renin-produzierende Zellen unterschiedlicher Altersstadien (1-34 Wochen) im Wildtyp; G-L: Renin-produzierende Zellen unterschiedlicher Altersstadien (1-34 Wochen) in der  $AS^{-/-}$ -Maus; aA: Afferente Arteriole; (\*): Glomerulus; Maßstabsbalken: 20  $\mu$ m;

In Nieren von 4 Wochen alten Tieren bildeten die perivaskulären Reninzellen bereits mehrschichtige, zusammenhängende Felder, die die afferente Arteriole manschettenartig umschlossen (s. Abb. 3.4 H).

Während der nächsten Wochen war ein weiterer Anstieg in der Zahl der Renin-bildenden Zellen zu erkennen, der zu immer ausgedehnteren Reninzellfeldern im juxtaglomerulären Bereich führte. Im Alter von 16-22 Wochen erreichte die

Anzahl der Reninzellen pro Glomerulus ihr Maximum und blieb anschließend konstant.

Eine Ausmessung der Fläche der juxtaglomerulären Reninzellfelder bestätigte die konstante Zunahme der Anzahl an Renin-positiven Zellen (s. Abb. 3.5 B). Die Fläche der Renin-positiven Felder stieg von ca. 500  $\mu\text{m}^2$  bei eine Woche alten Tieren auf einen Wert von etwa 5000  $\mu\text{m}^2$  für 16-34 Wochen alte Tiere.



**Abb. 3.5: Fläche Renin-positiver Zellen pro Glomerulus in Wildtyp- (A) und AS<sup>-/-</sup>-Mäusen (B) zu verschiedenen Altersstadien (1-34 Wochen).** Pro Zeitpunkt und Genotyp wurden je drei Tiere analysiert. Der Wert für jedes einzelne Tier ergab sich aus der Vermessung von je 15-20 Glomeruli. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM; (\*):  $p < 0,05$ ;

In den Wildtyp-Nieren zeigte sich im Vergleich mit Nieren aus AS<sup>-/-</sup>-Mäusen ein verändertes Bild (s. Abb. 3.4 A-F). Im Alter von einer Woche war die Reninzellzahl pro Glomerulus am höchsten (s. Abb. 3.4 A). Vier Wochen nach der Geburt war dagegen die Anzahl der Reninzellen deutlich zurückgegangen (s. Abb. 3.4 B). Die Renin-positiven Zellen fanden sich jetzt ausschließlich in juxtaglomerulärer Position. In den weiteren untersuchten Altersstadien änderte sich die Lokalisation und die Anzahl der Reninzellen pro Glomerulus in den Wildtyp-Mäusen nicht mehr (s. Abb. 3.4 B-F).

Die Fläche der Renin-positiven Zellen sank dabei von knapp 400  $\mu\text{m}^2$  (1 Woche) auf Werte um 200  $\mu\text{m}^2$  (4-34 Wochen) (s. Abb. 3.5 A).

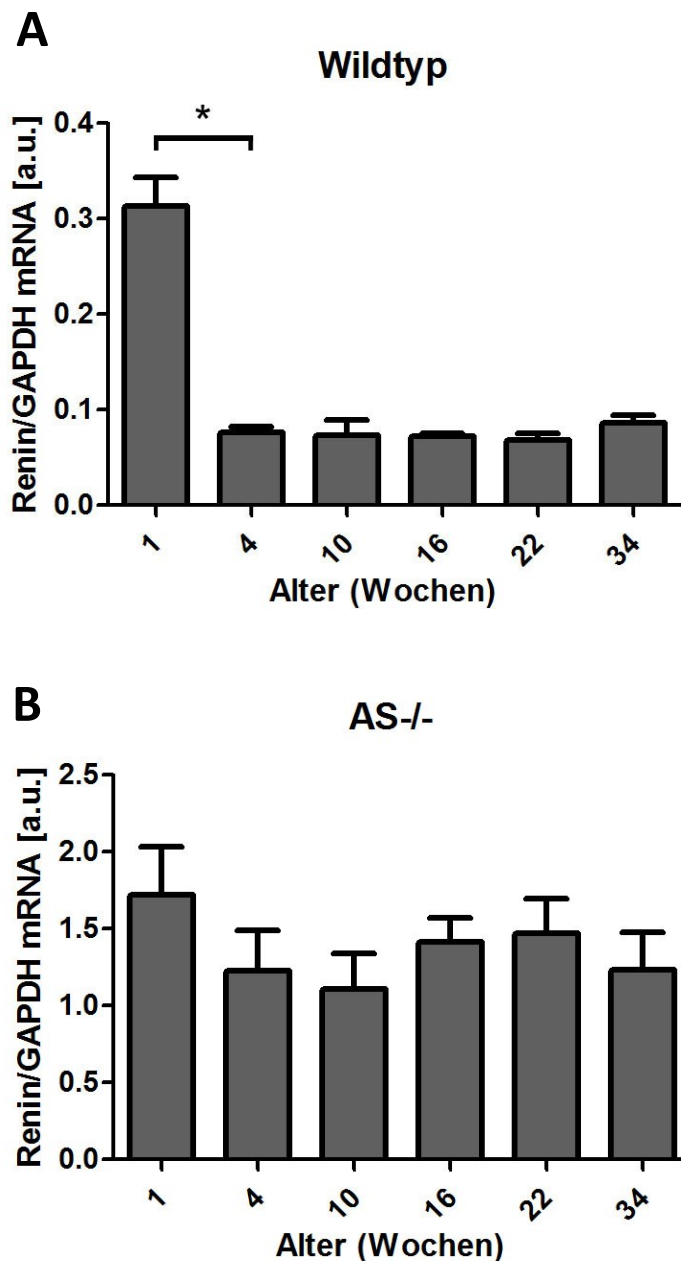
#### 3.1.1.3.2 Totale Renin-mRNA-Abundanz

Parallel zur immunhistochemischen Analyse der Reninzellanzahl wurde auch die totale Renin-mRNA in AS<sup>-/-</sup>-Mäusen altersabhängig untersucht. Im Alter von 1, 4, 10, 16, 22 und 34 Wochen wurde der Renin-mRNA-Gehalt mittels quantitativer Echtzeit-PCR bestimmt und ins Verhältnis zur mRNA des Haushaltsgens GAPDH gesetzt. Als Kontrolle dienten Wildtyp-Mäuse gleichen Alters.

Das Verhältnis Renin- zu GAPDH-mRNA änderte sich mit zunehmendem Alter der AS<sup>-/-</sup>-Mäuse nicht und zeigte während der verschiedenen untersuchten Altersstadien konstante Werte (s. Abb. 3.6 B).

Bei Wildtyp-Mäusen war die relative Renin-mRNA-Menge postpartal (1 Woche) am höchsten und nahm im weiteren Altersverlauf mit abgeschlossener Nierenentwicklung konstante Werte an (s. Abb. 3.6 A).

Im Mittel war der relative Renin-mRNA-Gehalt bei adulten AS<sup>-/-</sup>-Mäusen (4-34 Wochen) im Vergleich zum Wildtyp 18-fach erhöht ( $p < 0,05$ ).

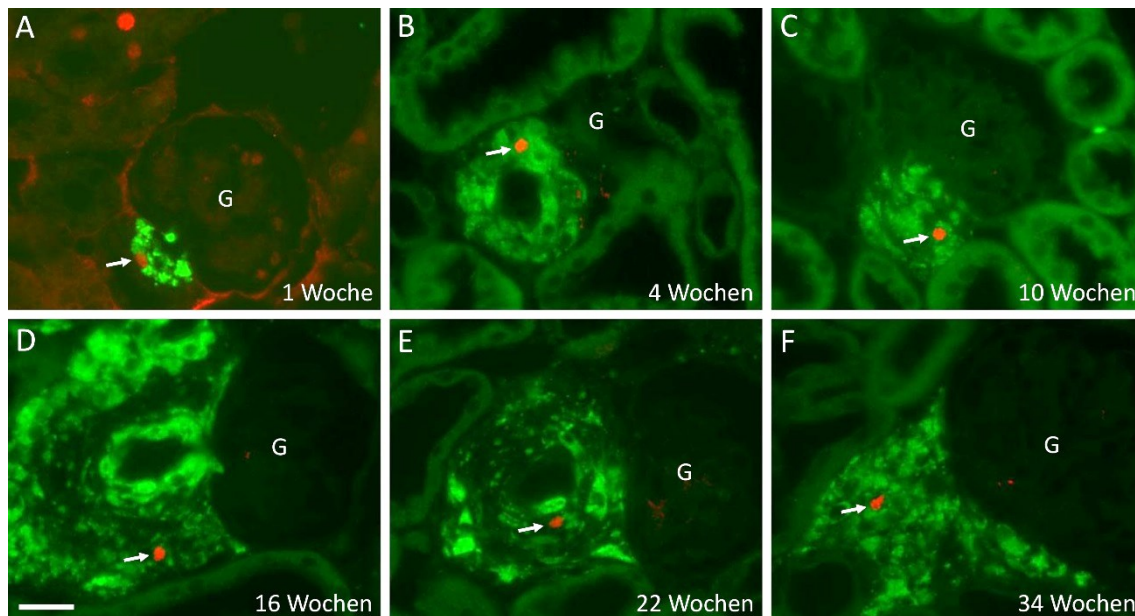


**Abb. 3.6:** Renale Renin-mRNA-Abundanz in Wildtyp- (A) und AS<sup>-/-</sup>-Mäusen (B) zu verschiedenen Altersstadien (1-34 Wochen). Die Daten stammen von 4-17 Tieren je Alterstadium und Genotyp. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM; (\*):  $p < 0,05$ ;

### 3.1.1.3.3 Proliferation perivaskulärer Reninzellen

Die Zunahme der Reninzellen in AS<sup>-/-</sup>-Mäusen weist auf die Möglichkeit einer mitotischen Vermehrung von Renin-produzierenden Zellen hin. Mit Hilfe eines Antikörpers gegen PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) war es möglich, mitotische Zellkerne in Nierenschnitten immunhistochemisch sichtbar zu machen.

Es wurden die Nierenschnitte von 1, 4, 10, 16, 22 und 34 Wochen alten  $AS^{-/-}$ -Mäusen auf Anzeichen für mitotische Zellteilungen im Bereich der perivaskulären Reninzellfelder hin untersucht.



**Abb. 3.7: Mitotische Zellen in perivaskulären Reninzellfeldern von  $AS^{-/-}$ -Mäusen zu verschiedenen Altersstadien (1-34 Wochen).** Dargestellt ist die immunhistochemische Färbung von Renin (grün) und PCNA (rot). Pfeile: PCNA-gefärbte Zellkerne; G: Glomerulus; Maßstabsbalken: 20  $\mu$ m;

In allen untersuchten Altersstadien (1-34 Wochen) fanden sich im Nierenkortex Aldosteronsynthase-defizienter Mäuse Anzeichen für mitotische Zellteilungen (s. Abb. 3.7 A-F, PCNA-positive Zellkerne gekennzeichnet durch Pfeile). PCNA-Signale zeigten sich vereinzelt in tubulären Zellen sowie auch innerhalb der perivaskulären Reninzellfelder. Das PCNA-Signal konnte hier eindeutig Renin-positiven Zellen zugeordnet werden. In etwa 20 % der Reninzellfelder von 4-22 Wochen alten Nieren fand man PCNA-Färbung. Mehr als 1-3 PCNA-Signale pro Reninzellfeld waren selten zu beobachten. In den kleineren Reninzellfeldern der eine Woche alten Nieren sowie im spätesten untersuchten Stadium (34 Wochen) fanden sich nur im Einzelfall Anzeichen für mitotische Teilungen.

In Wildtyp-Nieren zeigten sich PCNA-positive Zellen im Nierenkortex nur in tubulären Strukturen. In juxtaglomerulären Zellen ließ sich hier keine PCNA-Färbung finden.

#### 3.1.1.4 Zusammenfassung

In Nieren von Aldosteronsynthase-defizienten Mäusen zeigte sich eine stark erhöhte Anzahl Renin-produzierender Zellen. Diese fanden sich einerseits innerhalb der Gefäßwand der afferenten Arteriolen und andererseits außerhalb der Gefäßwand, wo sie mehrschichtige Zellfelder bildeten, die die präglomerulären Gefäße manschettenartig umschlossen. In ihrer Morphologie unterschieden sich diese perivaskulären Reninzellen nicht von den juxtaglomerulären Reninzellen im Wildtyp.

Es ließ sich zeigen, dass die Anzahl an Renin-produzierenden Zellen pro Glomerulus in AS<sup>-/-</sup>-Mäusen mit zunehmendem Alter ansteigt. Der Nachweis von PCNA in Zellkernen Renin-positiver Zellen weist dabei auf eine mitotische Vermehrung bestehender Reninzellen hin.

#### 3.1.2 Charakterisierung Renin-produzierender Zellen in AS<sup>-/-</sup>-Mäusen durch Nachweis von Zellmarker-Proteinen

In AS<sup>-/-</sup>-Mäusen treten, wie unter 3.1.1 beschrieben, zusätzlich zu den retrograd rekrutierten Reninzellen der präglomerulären Gefäße weitere Renin-produzierende Zellen auf, die - entgegen der typischen Position - außerhalb der Gefäße lokalisiert sind. Ob diese jedoch direkt von den vaskulären Reninzellen abstammen ist nicht bekannt.

Über den immunhistochemischen Nachweis verschiedener Zellmarker-Proteine sollte überprüft werden, ob perivaskuläre Reninzellen, genau wie retrograd rekrutierte Reninzellen von glatten Gefäßmuskelzellen abstammen oder ob diese vielmehr mit Perizyten-ähnlichen Zellen verwandt sind. Perizyten sind wenig differenzierte Zellen, die der Außenwand von kapillaren Blutgefäßen aufgelagert sind. Zu diesen zählen auch die Zellen des extra- und intraglomerulären Mesangiums, die eine spezialisierte Form der Perizyten darstellen (Kierszenbaum und Tres, 2012, Fawcett, 1998).

Um die Verwandtschaft mit glatten Gefäßmuskelzellen zu überprüfen, wurden die Glattnuskelzell-Marker Glattnuskelaktin und Sm22 verwendet. Als Perizyten-Marker dienten PDGF-Rezeptor- $\beta$  und das Proteoglycan NG2.



Außerdem wurde das Expressionsmuster von Kollagen I und seiner Vorstufe Prokollagen I untersucht. Experimente zeigten, dass die glatten Muskelzellen der präglomerulären Gefäße, die von Renin-produzierenden Zellen abstammen (Sequeira-Lopez *et al.*, 2004), auch zur Abstammungslinie Kollagen I-produzierender Zellen gehören (Florin *et al.*, 2004). Auch für renale Perizyten wurde die Produktion von Kollagen I nachgewiesen (Wiggins *et al.*, 1993; Lin *et al.*, 2008).

Weiterhin wurde das Verteilungsmuster des Gap-Junction-bildenden Proteins Connexin 40 (Cx40) sowie der Aldoketoreduktase 1B7 (AKR1B7) analysiert. Das Auftreten beider Proteine ist in der Wildtyp-Maus eng an die Synthese von Renin gebunden. In allen Renin-produzierenden Zellen der adulten Wildtyp-Niere finden sich sowohl Cx40 als auch AKR1B7 (Kurtz *et al.*, 2009 b; Machura *et al.*, 2012).

Nierenschnitte 10 Wochen alter AS<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden mit Antikörpern, die gegen die beschriebenen Proteine gerichtet waren, immunhistochemisch gefärbt und lichtmikroskopisch untersucht. Zum Vergleich wurde das Verteilungsmuster der jeweiligen Proteine in gleichaltrigen Wildtyp-Mäusen untersucht.

### 3.1.2.1 Glattmuskelaktin

Glattmuskelaktin ist als Teil des Aktin-Myosin-Komplexes verantwortlich für die Muskelzellkontraktion. Wie der Name bereits sagt, ist das Vorkommen von Glattmuskelaktin charakteristisch für glatte Muskelzellen. In der Niere findet es daher als Marker für alle arteriellen Gefäße Verwendung. In den juxtaglomerulären Zellen der *Media* der afferenten Arteriole kennzeichnet sein Auftreten den Übergang von Renin-produzierenden Zellen zu glatten Muskelzellen.

#### a) AS<sup>-/-</sup>

In den AS<sup>-/-</sup>-Nieren fand sich Glattmuskelaktin in allen glatten Muskelzellen der arteriellen Gefäße. In den afferenten Arteriolen zeigte sich zudem eine große Anzahl intermediärer Zellen, die sowohl Glattmuskelaktin als auch Renin beinhalten (s. Abb. 3.8 A und B).

In den Reninzellen der perivaskulären Felder war der Glattmuskelaktingehalt dagegen sehr gering. Der Übergang von Gefäß-lokalisierten Reninzellen zu

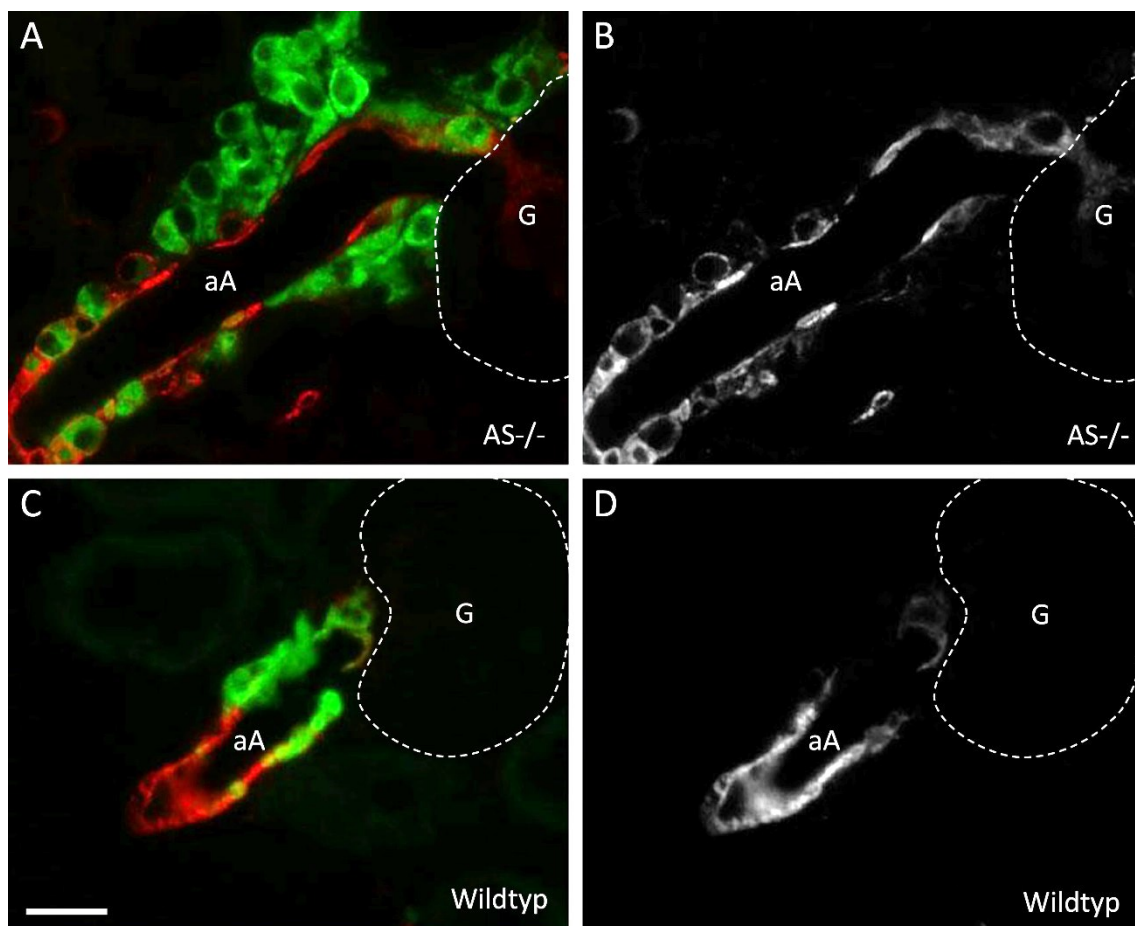
perivaskulären Reninzellen ließ sich eindeutig an einem Abfall der Glattmuskelaktin-Expression festmachen.

Weiteres Glattmuskelaktin fand sich in sehr geringem Maße im interstitiellen Bereich und im intraglomerulären Mesangium.

#### b) Wildtyp

In den Wildtypnieren (s. Abb. 3.8 C und D) zeigte sich reichhaltige Glattmuskelaktin-Expression in den glatten Muskelzellen der arteriellen Gefäße. Nahe des Glomerulus nahm der Gehalt an Glattmuskelaktin im Bereich der Intermediärzellen ab und die glatten Muskelzellen gingen im juxtaglomerulären Bereich in Renin-produzierende Zellen ohne Glattmuskelaktin über.

Zusätzlich zu den Gefäßmuskelzellen fand sich Glattmuskelaktin auch in geringem Maße im interstitiellen Raum sowie in intraglomerulären Mesangialzellen.



**Abb. 3.8:** Immunfluoreszenzfärbung für Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot) in AS<sup>-/-</sup> (A und B) und Wildtyp-Mäusen (C und D). aA: Afferente Arteriole; G: Glomerulus; Maßstabsbalken: 20 µm;



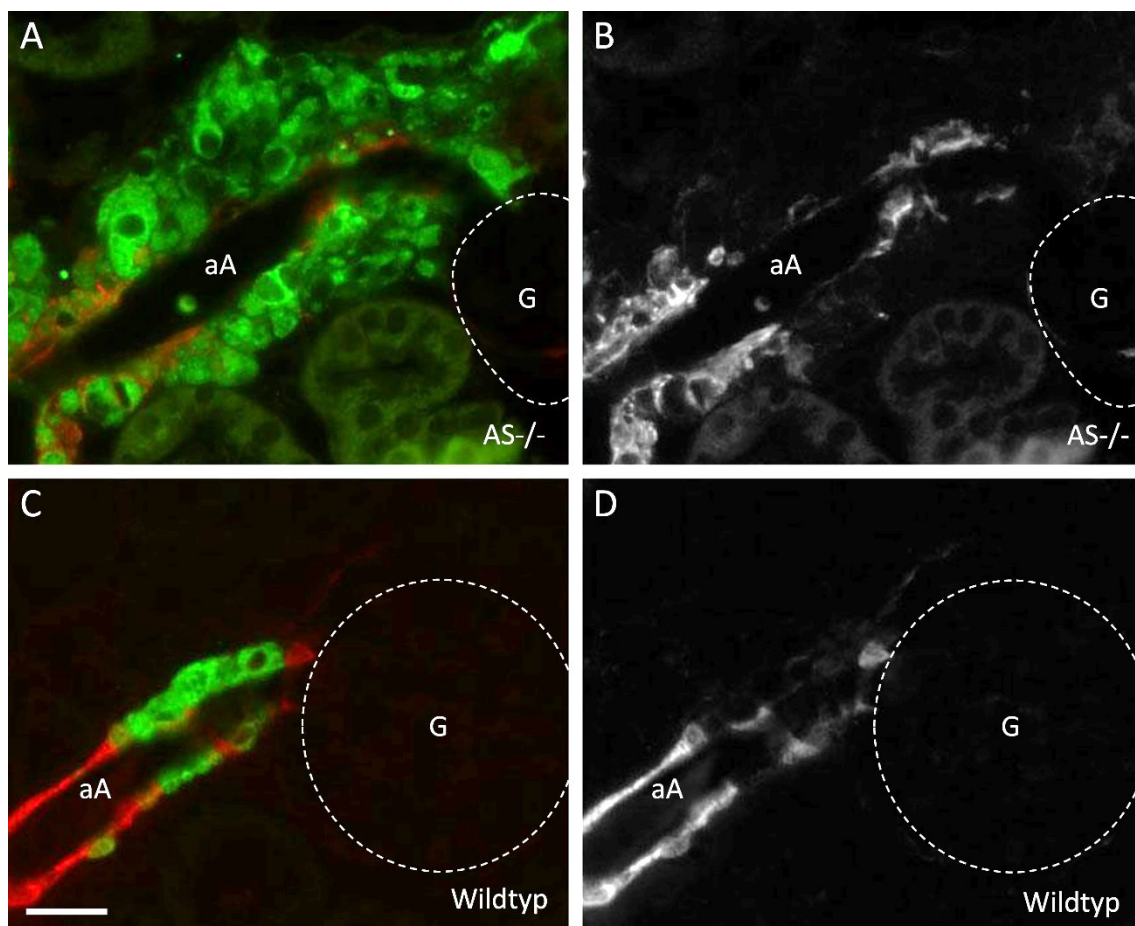
### 3.1.2.2 Sm22

Sm22 ist ein Calponin-verwandtes Protein, das spezifisch in glatten Muskelzellen exprimiert wird. Wie Glattmuskelaktin kann es daher in der Niere als Marker für glatte Muskulatur dienen.

#### a) $AS^{-/-}$

Sm22 fand sich in der  $AS^{-/-}$ -Niere genau wie Glattmuskelaktin in den arteriellen Gefäßen. In präglomerulären Gefäßzellen wurde die Expression von Sm22 mit dem Auftreten von Renin geringer. Dennoch ließ sich Sm22 auch noch in den Intermediärzellen nachweisen. Nur in wenigen voll ausdifferenzierten Reninzellen fehlte es völlig (s. Abb. 3.9 A und B).

Perivaskuläre Reninzellen zeigten unabhängig vom Maß der Renin-Expression keine Anzeichen für Sm22-Färbung.



**Abb. 3.9:** Immunfluoreszenzfärbung für Renin (grün) und Sm22 (rot) in  $AS^{-/-}$  (A und B) und Wildtyp-Mäusen (C und D). aA: Afferente Arteriole; G: Glomerulus; Maßstabsbalken: 20  $\mu$ m;

### b) Wildtyp

Auch in Wildtyp-Mäusen markierte das Auftreten von Sm22 die glatte Muskulatur des arteriellen Gefäßbaums. Im juxtaglomerulären Bereich war es in den Renin-positiven Zellen der afferenten Arteriole nur noch schwach zu erkennen (s. Abb. 3.9 C und D).

#### 3.1.2.3 PDGF-Rezeptor- $\beta$

PDGF-Rezeptor- $\beta$  (PDGFR- $\beta$ ) gehört zur Rezeptor-Familie der Tyrosinkinasen. Dieser Rezeptor sitzt auf der Oberfläche von Zellen und bindet hier Wachstumsfaktoren aus der PDGF-Familie. Dadurch trägt PDGFR- $\beta$  zur Regulation wichtiger Vorgänge in der Zelle bei. Dazu zählt die Regulation der Zellproliferation und -differenzierung sowie Wachstum und Migration von Zellen. In der Niere ist PDGFR- $\beta$  u. a. an der Bildung des kapillaren Netzwerks im Glomerulus beteiligt (Lindahl *et al.*, 1998).

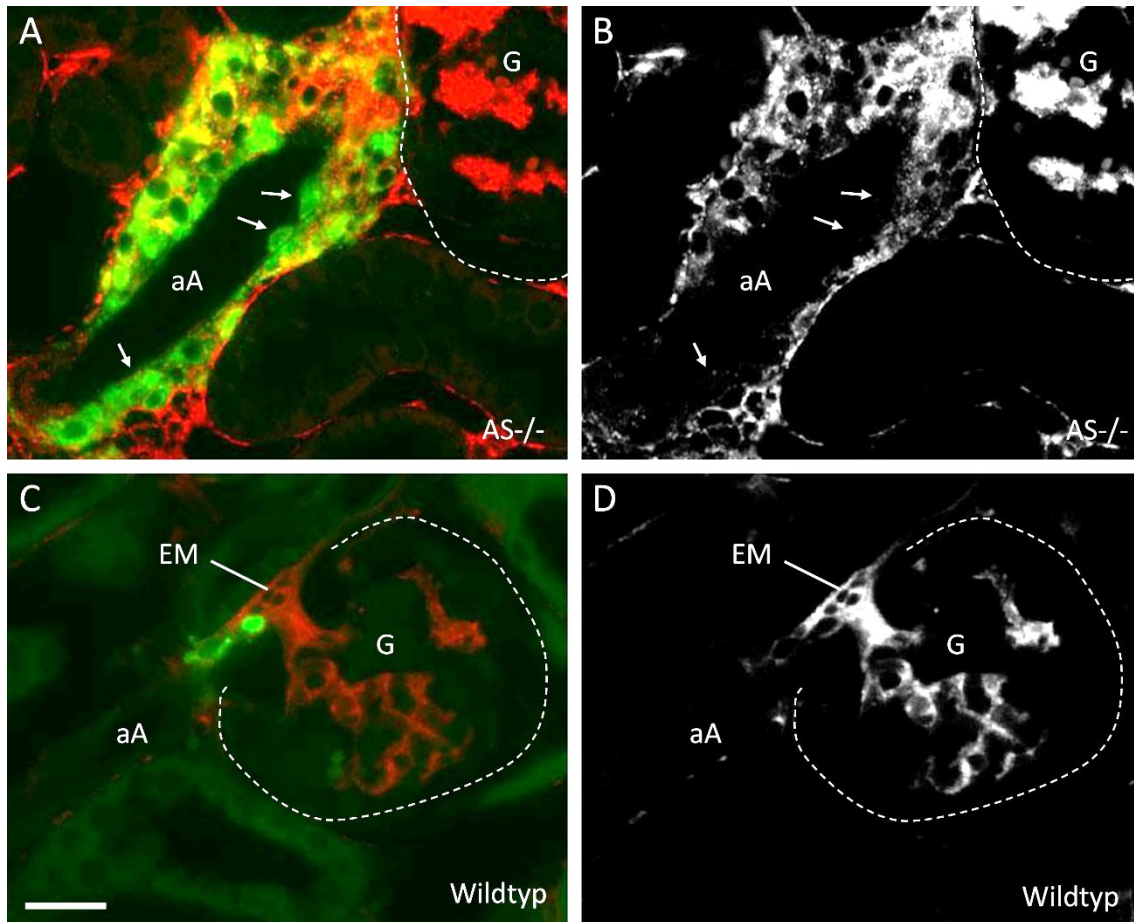
### a) AS<sup>-/-</sup>

Wie Abb. 3.10 (A und B) zeigt, fand sich PDGFR- $\beta$ -spezifische Fluoreszenz in Nierenschnitten von AS<sup>-/-</sup>-Mäusen im Bereich der Renin-positiven Zellen. Es zeigte sich allerdings ein Unterschied zwischen vaskulären und perivaskulären Reninzellen.

Weder in den glatten Muskelzellen noch in den Renin-produzierenden Zellen der präglomerulären Gefäße (gekennzeichnet durch Pfeile in Abb. 3.10 A und B) fand sich eindeutige PDGFR- $\beta$ -Expression.

Beim Blick auf die perivaskulären Reninzellfelder wurde jedoch deutlich, dass hier die Renin-produzierenden Zellen auch PDGFR- $\beta$  exprimierten. Alle sich hier befindenden Renin-positiven Zellen zeigten auch ein Fluoreszenz-Signal für PDGFR- $\beta$ .

Weiteres PDGFR- $\beta$ -Signal fand sich im Nierencortex der AS<sup>-/-</sup>-Mäuse in tubulointerstitiellen Zellen sowie im Glomerulus in den intraglomerulären Mesangialzellen.



**Abb. 3.10:** Immunfluoreszenzfärbung für Renin (grün) und PDGF-Rezeptor-β (rot) in *AS*<sup>-/-</sup> (A und B) und Wildtyp-Mäusen (C und D). aA: Afferente Arteriole; G: Glomerulus; Pfeile: Vaskuläre Reninzellen; EM: Extraglomeruläres Mesangium; Maßstabsbalken: 20 μm;

#### b) Wildtyp

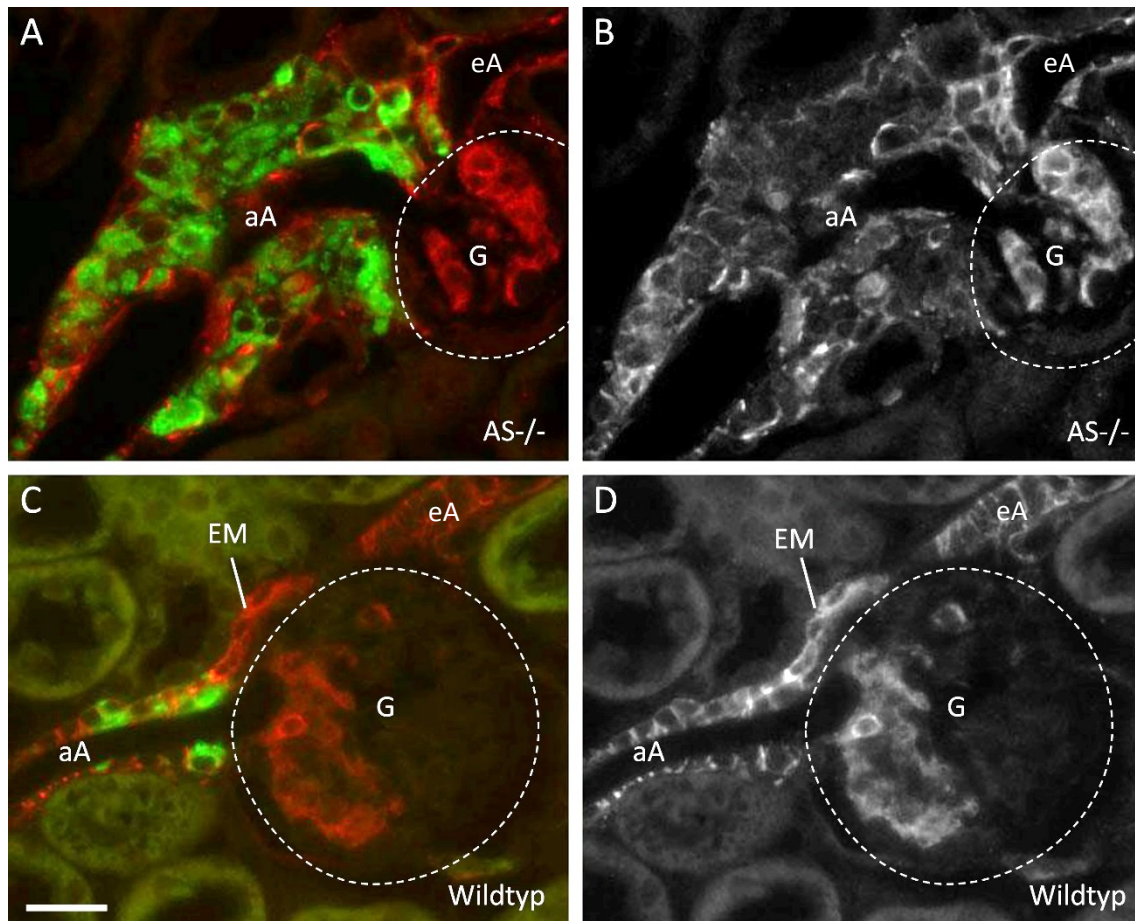
In den Renin-produzierenden Zellen der Wildtyp-Niere (s. Abb. 3.10 C und D) ließ sich PDGFR-β, genau wie in den übrigen Gefäßzellen immunhistochemisch nicht eindeutig nachweisen.

Jedoch zeigte sich starke PDGFR-β-Fluoreszenz in direkter Nachbarschaft zu den Renin-bildenden juxtaglomerulären Zellen im Bereich des extraglomerulären Mesangiums.

Weitere PDGFR-β-positive Zellen fanden sich im Interstitium sowie im intraglomerulären Mesangium.

### 3.1.2.4 NG2

NG2 ist ein membranständiges Proteoglycan, das in der Plasmamembran verschiedener Zelltypen zu finden ist. Durch Interaktion mit verschiedenen Liganden wie Wachstumsfaktoren (Goretzki *et al.*, 1999) und Proteinen (Goretzki *et al.*, 2000; Iida *et al.*, 2001) beeinflusst es hier u. a. Proliferation, Migration und Wachstum der Zellen.



**Abb. 3.11:** Immunfluoreszenzfärbung für Renin (grün) und NG2 (rot) in AS<sup>-/-</sup>- (A und B) und Wildtyp-Mäusen (C und D). aA: Afferente Arteriole; eA: efferente Arteriole; G: Glomerulus; EM: Extraglomeruläres Mesangium; Maßstabsbalken: 20 µm;

#### a) AS<sup>-/-</sup>

In der AS<sup>-/-</sup>-Maus war NG2-Färbung in allen Renin-positiven Zellen zu beobachten (s. Abb. 3.11 A und B).

Die NG2-Färbung war allerdings nicht in allen Reninzellen gleich stark. Reninzellen mit starkem NG2-Signal fanden sich insbesondere im Bereich des extraglomerulären Mesangiums zwischen der afferenten und efferenten Arteriole.



Zusätzlich zu den Renin-positiven Zellen fand sich verstärkte NG2-Fluoreszenz in allen Gefäßmuskelzellen der prä- und postglomerulären Gefäße sowie im Bereich des intraglomerulären Mesangiums.

#### b) Wildtyp

In der Wildtyp-Niere zeigten sich alle untersuchten Reninzellen auch NG2-positiv (s. Abb. 3.11 C und D).

NG2 fand man außerdem innerhalb der Gefäße, im intraglomerulären Mesangium und am Gefäßpol der Glomeruli im extraglomerulären Mesangium.

### 3.1.2.5 Kollagen I

Kollagen I ist ein Strukturprotein der extrazellulären Matrix. Experimente zur Verfolgung der Abstammungslinie Kollagen I exprimierender Zellen der Niere (Florin *et al.*, 2004) zeigten einen Zusammenhang mit der Abstammungslinie Renin-produzierender Zellen (Sequeira-Lopez *et al.*, 2004).

#### a) AS<sup>-/-</sup>

Weder in den glatten Gefäßmuskelzellen noch in den Renin-produzierenden Zellen der afferenten Arteriole konnte Kollagen I eindeutig nachgewiesen werden. Kollagen I-Fluoreszenz innerhalb der Gefäße war nicht vom Hintergrund-Signal zu unterscheiden (vaskuläre Reninzellen gekennzeichnet durch Pfeile in Abb. 3.12 A und B)

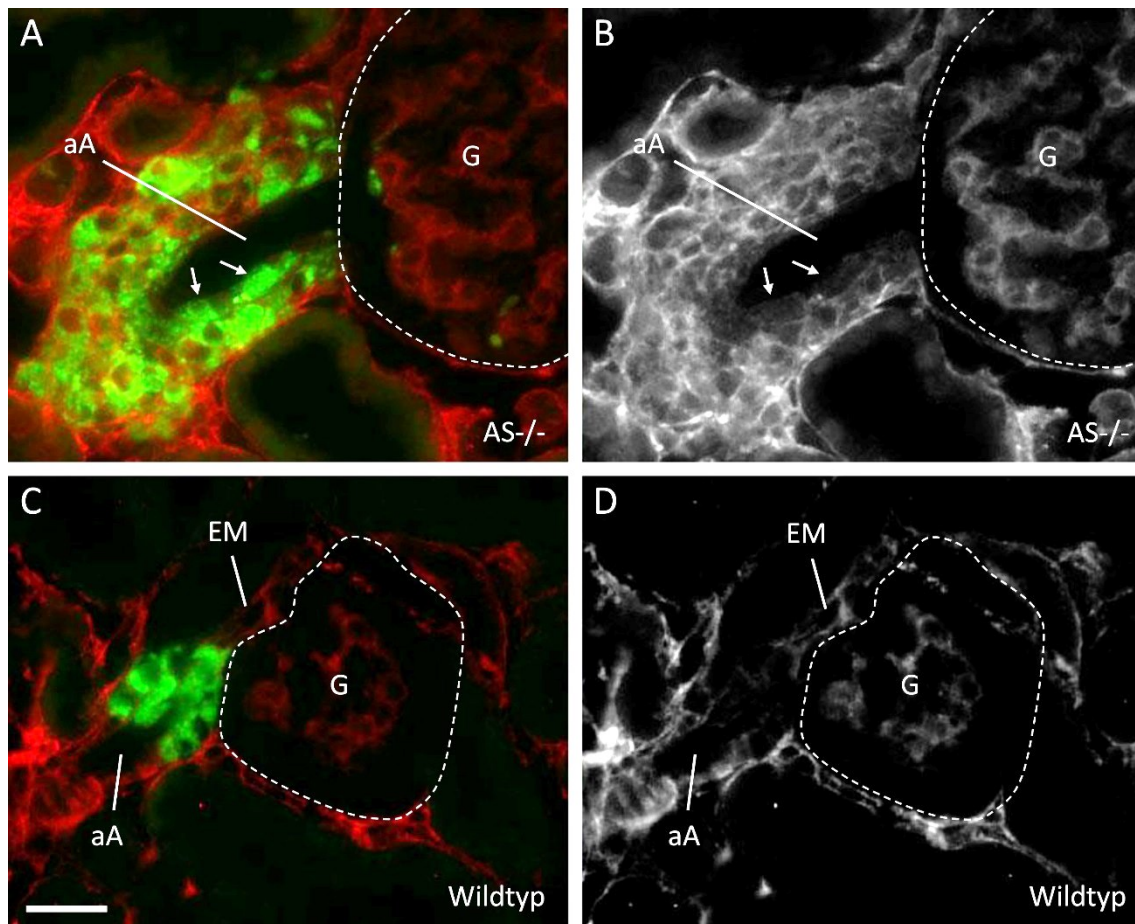
Jedoch fand sich Kollagen I-Färbung bei der Betrachtung der um die Gefäße liegenden Reninzellfelder. Hier zeigte sich im Extrazellularraum zwischen allen Renin-positiven Zellen starke Kollagen I-Fluoreszenz (s. Abb. 3.12 A und B).

Zusätzlich fand sich Kollagen I-Expression im Nierenkortex der AS<sup>-/-</sup>-Mäuse im gesamten tubulointerstitiellen Raum sowie zu einem geringeren Anteil im Bereich der Mesangialzellen des Glomerulus.

#### b) Wildtyp

Auch in der Wildtyp-Maus ließ sich Kollagen I in den Renin-produzierenden Zellen der afferenten Arteriole nicht eindeutig nachweisen.

Kollagen I exprimierende Zellen fanden sich zum Großteil im interstitiellen Bereich. Zudem fand sich Kollagen I-Signal im intra- und extraglomerulären Mesangium (s. Abb. 3.12 C und D)



**Abb. 3.12:** Immunfluoreszenzfärbung für Renin (grün) und Kollagen I (rot) in AS<sup>-/-</sup> (A und B) und Wildtyp-Mäusen (C und D). aA: Afferente Arteriole; G: Glomerulus; EM: Extraglomeruläres Mesangium; Pfeile: Vaskuläre Reninzellen; Maßstabsbalken: 20 µm;

### 3.1.2.6 Prokollagen I

Neben Kollagen I wurde auch das Vorkommen von Prokollagen I im Nierenkortex der AS<sup>-/-</sup>-Mäuse untersucht. Prokollagen I stellt die unreife Vorläuferform der Kollagen I-Moleküle dar. Die reife Form des Peptids entsteht durch Abspaltung eines kurzen N-terminalen Bereichs von Prokollagen I. Ein Antikörper, der an diesen N-terminalen Teil bindet, erlaubte den Nachweis der unreifen Prokollagen I-Peptide (Kaarteenaho-Wiik *et al.*, 2007).

## a) AS-/-

Prokollagen I-positive Zellen zeigten sich im Kortex der Nieren von AS<sup>-/-</sup>-Mäusen ausschließlich im Bereich der Renin-produzierenden Zellen (s. Abb. 3.13 A und B). In keinen anderen Nierenzellen konnte Prokollagen I nachgewiesen werden. Genauere Betrachtung der Renin-bildenden Zellen zeigte, das Prokollagen I nicht mit allen Reninzellen kolokalisierte.

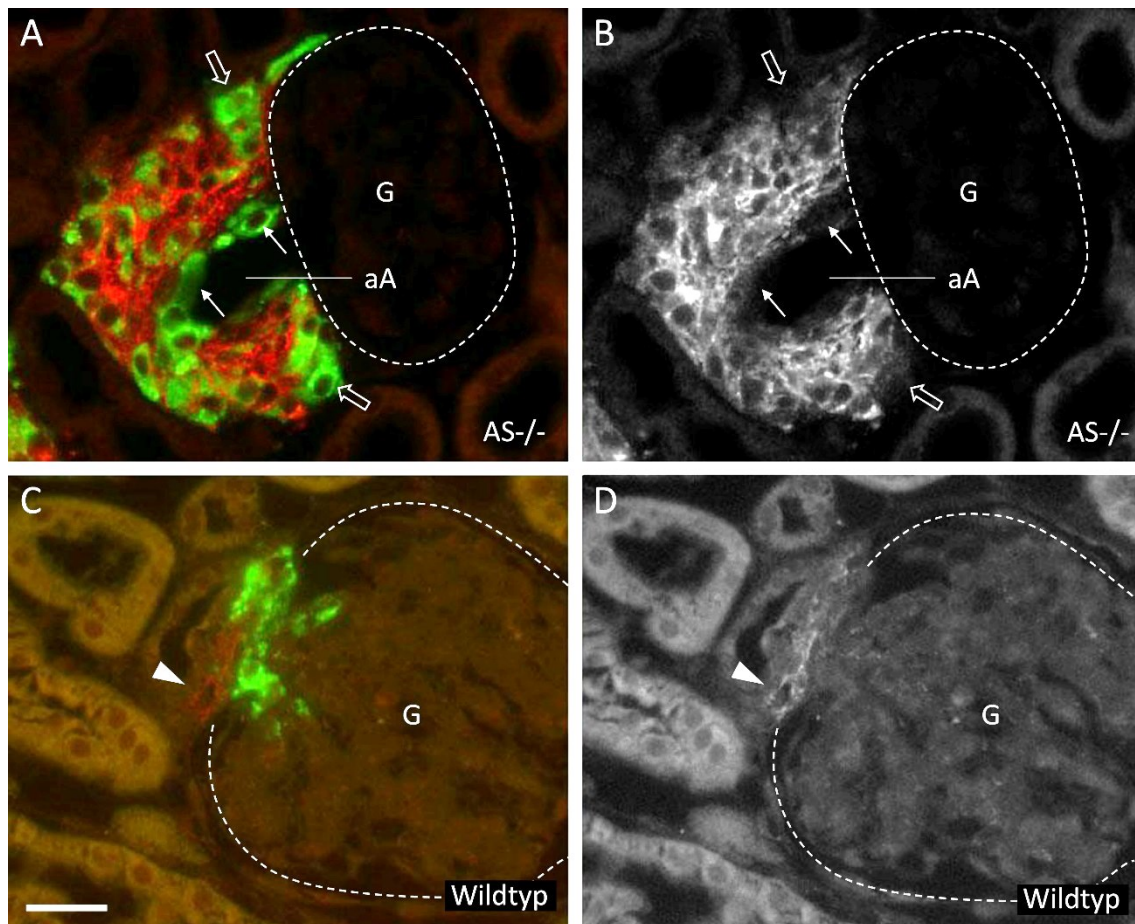
Reninzellen in der Wand der präglomerulären Gefäße waren stets frei von Prokollagen-Expression (exemplarische Zellen gekennzeichnet durch Pfeile in Abb. 3.13 A und B). Weder die juxtaglomerulären Reninzellen noch weiter distal liegende Reninzellen der afferenten Arteriole und der *Interlobular*-Arterie zeigten Anzeichen für das Vorhandensein von Prokollagen I.

Sobald man jedoch Reninzellen außerhalb der Gefäßwand in den perivaskulären Feldern betrachtete, zeigten diese eine klare Kolokalisation mit Prokollagen I. Hier wurde jedoch auch deutlich, dass das Prokollagen I-Signal nicht in allen perivaskulären Zellen gleich stark vorhanden war. In Zellen, die eine starke Renin-Färbung aufwiesen, ließ sich Prokollagen I nur schwer nachweisen (exemplarische Zellen gekennzeichnet durch leere Pfeilspitzen in Abb. 3.13 A und B). Dagegen fand sich eine umso stärkere Prokollagen I- Färbung in Zellen mit schwachem Renin-Signal.

## b) Wildtyp

In den zum Vergleich untersuchten Nierenschnitten von Wildtyp-Mäusen fand sich Prokollagen I einzig in wenigen Zellen im Bereich des extraglomerulären Mesangiums, lokalisiert zwischen *Macula densa*-Region und juxtaglomerulären Zellen (gekennzeichnet durch Pfeilspitze in Abb. 3.13 C und D).

Unter den übrigen Nierenzellen fanden sich keine weiteren Prokollagen I-positiven Zellen.



**Abb. 3.13:** Immunfluoreszenzfärbung für Renin (grün) und Prokollagen I (rot) in *AS*<sup>-/-</sup> (A und B) und Wildtyp-Mäusen (C und D). aA: Afferente Arteriole; G: Glomerulus; Pfeile: Vaskuläre Reninzellen; leere Pfeile: Renin-positive Zellen mit schwacher Prokollagen I-Produktion; Pfeilspitze: Prokollagen I-Färbung im extraglomerulären Mesangium; Maßstabsbalken: 20  $\mu$ m;

### 3.1.2.7 Connexin 40

Connexin 40 ist ein Gap-Junction bildendes Protein, welches die juxtaglomerulären Zellen untereinander, mit dem Endothel der Blutgefäße und mit dem benachbarten extraglomerulären Mesangium verbindet. Studien zeigten, dass die Expression von Cx40 eng mit der Synthese von Renin verbunden ist (Kurtz *et al.*, 2009 b).

#### a) *AS*<sup>-/-</sup>

Die vaskulär lokalisierten Reninzellen inklusive der juxtaglomerulären Zellen wiesen allesamt eine starke Cx40-Färbung auf (s. Abb. 3.14 A und B).

Auch in den perivaskulären Zellfeldern zeigten alle Reninzellen eine starke Produktion von Cx40. Die Stärke der Cx40 Expression war dabei jeweils unabhängig von der Stärke der Renin-Expression. Sobald sich in einer Zelle Renin nachweisen ließ, fand sich eine konstant starke Cx40-Färbung.



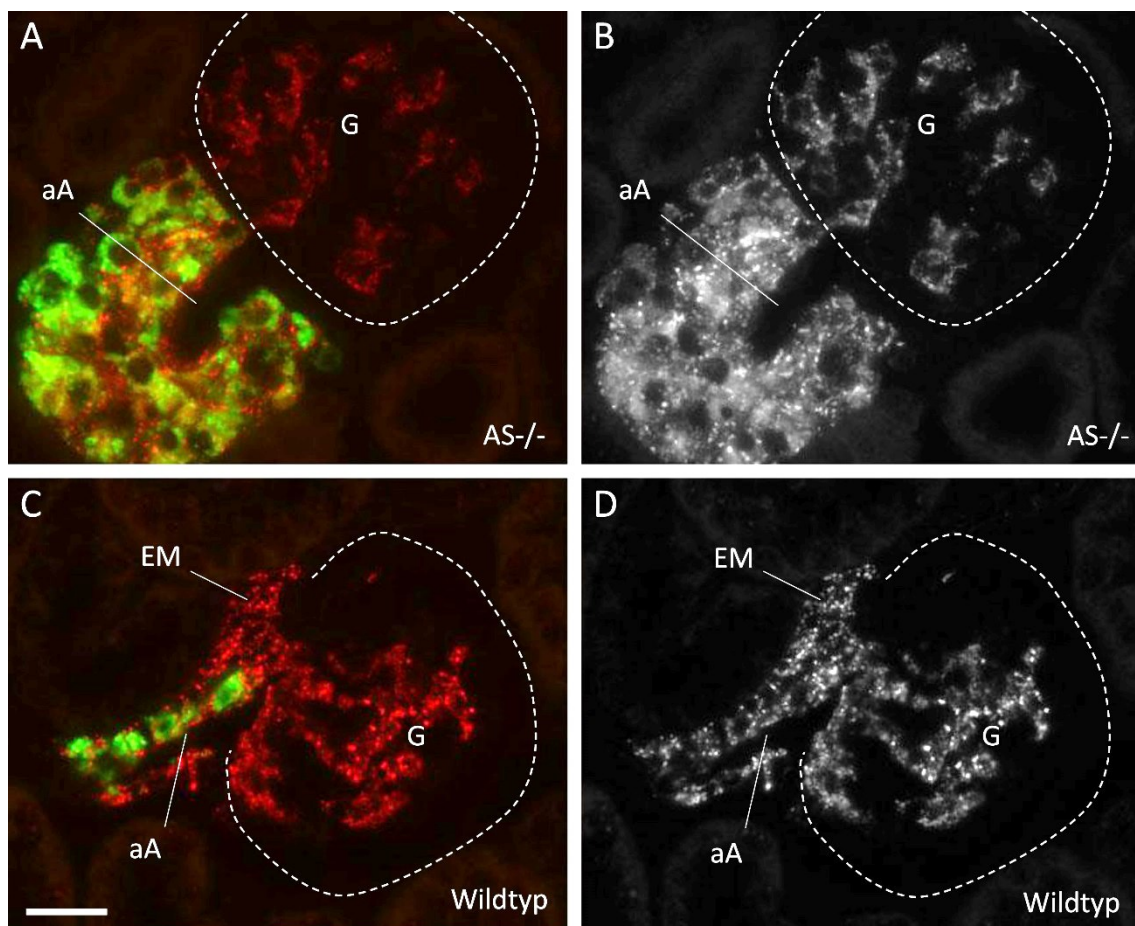
Neben den Renin-produzierenden Zellen zeigte sich Cx40 auch im Endothel der Blutgefäße sowie innerhalb des Glomerulus in den intraglomerulären Mesangialzellen.

#### b) Wildtyp

Im Wildtyp zeigten die juxtaglomerulären Reninzellen reichhaltige Cx40-Produktion (s. Abb. 3.14 C und D).

Auch in den, an die Reninzellen angrenzenden, extraglomerulären Mesangialzellen war eine starke Cx40-Färbung festzustellen.

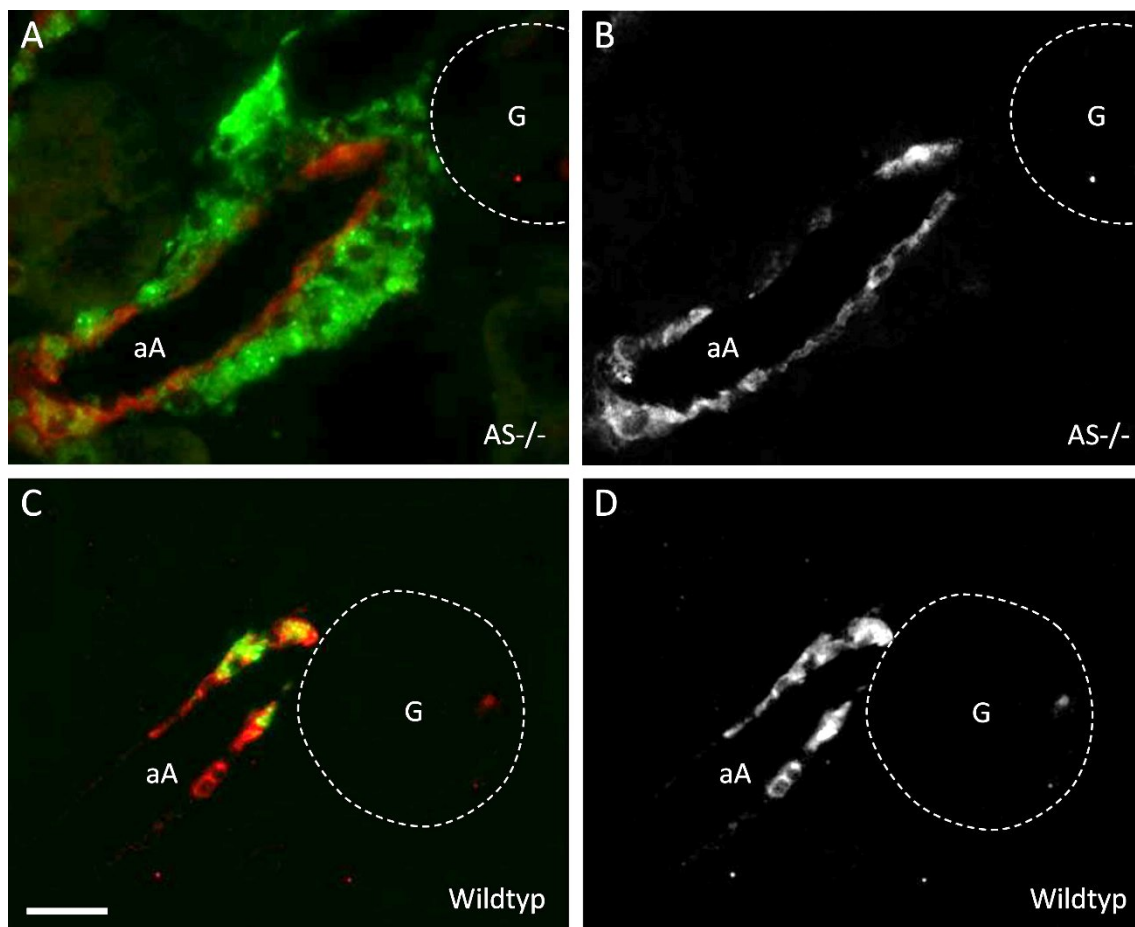
Weiterhin ließ sich Cx40-Protein im Endothel der Blutgefäße sowie im intraglomerulären Mesangium nachweisen.



**Abb. 3.14:** Immunfluoreszenzfärbung für Renin (grün) und Connexin 40 (rot) in AS<sup>-/-</sup> (A und B) und Wildtyp-Mäusen (C und D). aA: Afferente Arteriole; G: Glomerulus; EM: Extraglomeruläres Mesangium; Maßstabsbalken: 20 µm;

### 3.1.2.8 Aldoketoreduktase 1B7

Genexpressions-Analysen an isolierten Reninzellen zeigten, dass diese im Vergleich zu den übrigen Nierenzellen Aldoketoreduktase 1B7 verstärkt exprimierten. In weiteren Analysen, in denen ein AKR1B7-spezifischer Antikörper zur Färbung von Wildtyp-Nierenschnitten verwendet wurde, konnte diese Aussage immunhistochemisch belegt werden. Stimulierung des RAAS bewirkte zudem, dass glatte Muskelzellen im Zuge der Transformation zu Renin-bildenden Zellen vermehrt AKR1B7 produzierten (Brunskill *et al.*, 2011; Machura *et al.*, 2012).



**Abb. 3.15:** Immunfluoreszenzfärbung für Renin (grün) und AKR1B7 (rot) in AS<sup>-/-</sup> (A und B) und Wildtyp-Mäusen (C und D). aA: Afferente Arteriole; G: Glomerulus; Maßstabsbalken: 20 µm;

a) AS<sup>-/-</sup>

AKR1B7 fand sich in allen vaskulären Reninzellen - egal ob es sich um juxtaglomeruläre oder weiter distal liegende Zellen handelte.

Im Bereich der perivaskulären Reninzellfelder ließ sich dagegen kein AKR1B7-Signal nachweisen (s. Abb. 3.15 A und B).

## b) Wildtyp

Im Wildtyp fand sich in allen Renin-produzierenden juxtaglomerulären Zellen AKR1B7-Fluoreszenz (s. Abb. 3.15 C und D).

Auch die angrenzenden Intermediärzellen in der *Media* der afferenten Arteriole zeigten sich AKR1B7-positiv.

In den übrigen Wildtyp-Nierenzellen ließ sich kein weiteres AKR1B7 nachweisen.

## 3.1.2.9 Zusammenfassung

Die Untersuchung verschiedener Zellmarker-Proteine zeigte, dass Unterschiede im Genexpressionsmuster zwischen vaskulären und perivaskulären Reninzellen von AS<sup>-/-</sup>-Mäusen bestehen (s. Tab. 1).

So finden sich im Bereich der perivaskulären Reninzellen weder die Glattmuskelzellmarker Glattmuskelaktin und Sm22 noch Aldoketoreduktase 1B7 - stattdessen produzieren diese Zellen im Vergleich zu den Gefäß-lokalisierten Reninzellen vermehrt Kollagen I und Prokollagen I sowie PDGF-Rezeptor-β. Genau wie die vaskulären Reninzellen sind auch die Reninzellen der perivaskulären Felder über Cx40-haltige Gap-Junctions miteinander verbunden.

	Vaskuläre Reninzellen	Perivaskuläre Reninzellen
Glattmuskelaktin	±	-
Sm22	±	-
PDGF-Rezeptor-β	±	+
NG2	±	±
Kollagen I	-	+
Prokollagen I	-	+
Connexin 40	+	+
AKR1B7	+	-

+ starke Expression;
 ± schwache Expression;
 - keine Expression;

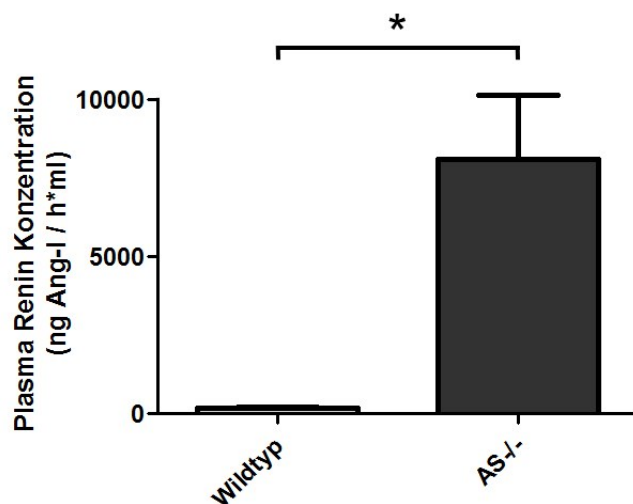
Tab. 1: Expression von Zellmarker-Proteinen in vaskulären und perivaskulären Reninzellen der AS<sup>-/-</sup>-Maus.

### 3.1.3 Funktionalität

Die Betrachtung Renin-produzierender Zellen von  $AS^{-/-}$ -Mäusen machte, wie unter 3.1.2 beschrieben, deutlich, dass Unterschiede im Genexpressionsmuster zwischen vaskulären und perivaskulären Reninzellen bestehen. Dies warf die Frage auf, ob es auch funktionelle Unterschiede zwischen diesen beiden Formen Renin-produzierender Zellen gibt. Um diese Frage zu untersuchen, wurde die Regulation der Reninsekretion in Aldosteronsynthase-defizienten Mäusen analysiert und mit der Reninsekretion in Wildtyp-Mäusen verglichen. So sollte überprüft werden, ob sich die Sekretion von Renin in den perivaskulären Zellen der Reninzellfelder in gleicher Weise regulieren lässt wie in den klassischen juxtaglomerulären Reninzellen.

#### 3.1.3.1 Plasma-Renin-Konzentration

Die Messung der Renin-katalysierten Umsetzung von Angiotensinogen zu Angiotensin I diente der Bestimmung der Renin-Konzentration im Blutplasma. Es wurde das Blutplasma von adulten Aldosteronsynthase-defizienten Mäusen im Alter von 10-22 Wochen analysiert und die Ergebnisse mit gleichaltrigen Wildtyp-Mäusen verglichen.



**Abb. 3.16: Plasma-Renin-Konzentration in Wildtyp und  $AS^{-/-}$ -Maus.** Die Daten stammen von 3 (Wildtyp) bzw. 21 ( $AS^{-/-}$ ) Tieren im Alter von 10-22 Wochen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM; (\*):  $p < 0,05$ ;

Die erhaltenen Plasma-Renin-Konzentrations-Werte lagen bei den untersuchten Aldosteronsynthese-defizienten Tieren im Mittel 45-fach höher als bei der Kontrollgruppe (8117 ng Ang I/h\*ml in AS<sup>-/-</sup> zu 181 ng Ang I/h\*ml in WT) (s. Abb. 3.16).

### 3.1.3.2 Regulation der Renin-Sekretion am Modell der isoliert perfundierten Niere

Am Modell der isoliert perfundierten Niere konnte der Einfluss verschiedener Wirkstoffe und Stimuli auf die Renin-Sekretion *in vivo* überprüft werden.

Die Basalwerte der Renin-Sekretionsrate (bei konstantem Perfusionsdruck von 90 mmHg) lagen in der isoliert perfundierten AS<sup>-/-</sup>-Niere sechsmal höher als in der Wildtyp-Niere ( $312 \pm 35$  ng ANG I/h\*min\*g in AS<sup>-/-</sup> und  $54 \pm 5$  ng ANG I/h\*min\*g in WT) (s. Abb. 3.17 A).

#### Zugabe von Isoproterenol

Das Sympathische Nervensystem ist als wichtiger Regulator der Renin-Sekretion bekannt. Durch Bindung von Katecholaminen an  $\beta$ 1-adrenerge Rezeptoren wird in juxtaglomerulären Zellen die Aktivität der Adenylylzyklase gesteigert. Dies führt zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration, die die Synthese und Sekretion von Renin stimuliert (Holmer *et al.*, 1997; Wagner *et al.*, 1999).

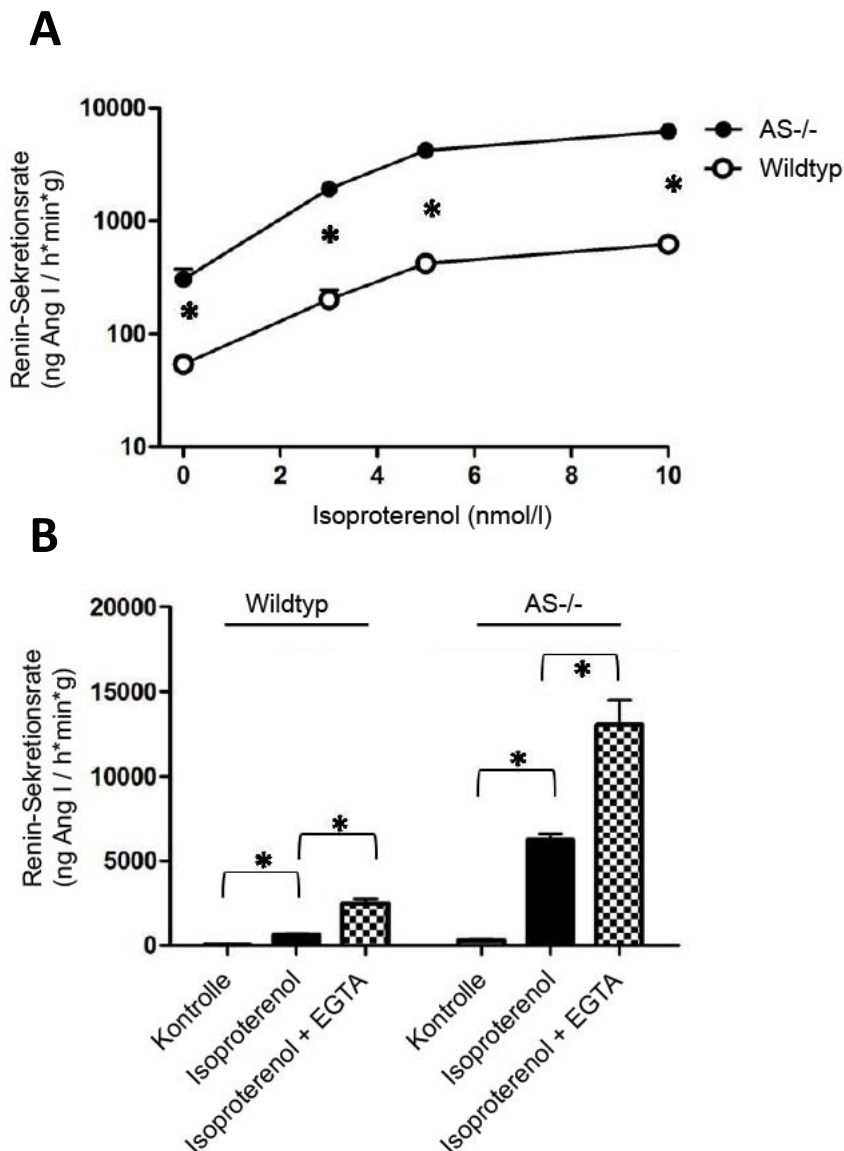
Durch Zugabe des  $\beta$ -Adrenorezeptor-Liganden Isoproterenol zum Perfusat sollte untersucht werden, ob sich die Renin-Sekretion in AS<sup>-/-</sup>-Nieren durch Aktivierung  $\beta$ 1-adrenerger Rezeptoren stimulieren lässt. Wie Abbildung 3.17 A zeigt, ließ sich die Renin-Sekretionsrate sowohl in der Wildtyp- als auch in der AS<sup>-/-</sup>-Niere durch Zugabe von Isoproterenol konzentrationsabhängig erhöhen. Dabei war der Wert für die Renin-Sekretionsrate in AS<sup>-/-</sup>-Tieren jeweils um das 10-fache höher im Vergleich zum Wildtypen.

#### Zugabe von EGTA

Ein weiterer Regulator der Renin-Sekretion ist die intrazelluläre Kalzium-Konzentration. Während in anderen Zellen eine Erhöhung der Kalzium-Konzentration einen stimulierenden Effekt auf die Sekretion hat, bewirkt dies in Renin-bildenden Zellen genau das Gegenteil. Erhöhte intrazelluläre Kalzium-

Konzentrationen bewirken hier eine Hemmung der Renin-Freisetzung (Schweda und Kurtz, 2004; Grünberger *et al.*, 2006).

Eine Erniedrigung des extrazellulären Kalziums durch Zugabe von EGTA (3,1 mmol/l) zum Perfusat führte sowohl in Wildtyp- als auch in AS<sup>-/-</sup>-Nieren nach vorheriger Stimulierung mit Isoproterenol zu einem deutlichen Anstieg der Renin-Sekretion auf einen 2-3 fach höheren Wert (s. Abb. 3.17 B).

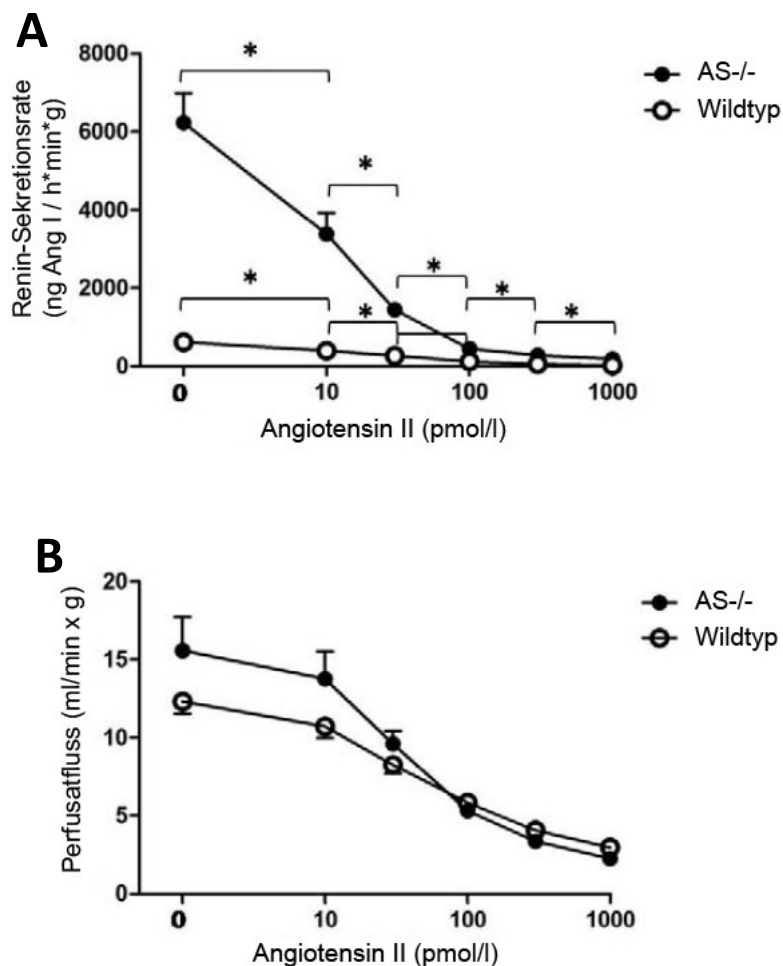


**Abb. 3.17: Auswirkung von Isoproterenol (A) und EGTA (B) auf die Renin-Sekretion in isoliert perfundierten Nieren von Wildtyp und AS<sup>-/-</sup>-Mäusen.** Bild A zeigt die Auswirkung steigender Isoproterenol-Konzentrationen auf die Reninsekretion. Bild B zeigt den Effekt der Zugabe von EGTA auf die Reninsekretion. EGTA (3,1 mmol/l) wurde am Ende des Dosis-Wirkungs-Experiments mit Isoproterenol bei einer Isoproterenol-Konzentration von 10 nmol/l zum Perfusat zugegeben. Die Werte zeigen die Renin-Sekretions-Rate vor Beginn des Dosis-Wirkungs-Experiments (Kontrolle), bei einer Isoproterenol-Konzentration von 10 nmol/l und nach Zugabe von EGTA (+ Isoproterenol). Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von fünf Nieren pro Genotyp. (\*):  $p < 0,05$ ;

### Zugabe von Angiotensin II

Bindung von Angiotensin II an AT1-Rezeptoren der juxtaglomerulären Zellen führt zu einer Hemmung der Renin-Synthese und -Sekretion (Campell, 1996). Dies geschieht über Aktivierung der Phospholipase C, was wiederum die intrazelluläre Kalzium-Konzentration erhöht (Kurtz und Penner, 1989).

Zugabe von Angiotensin II in ansteigender Konzentration nach vorheriger Stimulierung mit Isoproterenol (10 nmol/l) führte in beiden Genotypen zu einer Inhibierung der Renin-Sekretion (s. Abb. 3.18 A). In der AS<sup>-/-</sup>-Niere fiel die Renin-Sekretionsrate von durchschnittlich 6221 ng ANG I/h\*min\*g (ohne ANG II) auf 191 ng ANG I/h\*min\*g (1 nmol/l ANG II). In der Wildtyp-Niere war ein Abfall von 622 ng ANG I/h\*min\*g auf 28 ng ANG I/h\*min\*g festzustellen.



**Abb. 3.18:** Auswirkung ansteigender Angiotensin II-Konzentrationen auf Renin-Sekretion (A) und Perfusatfluss (B) in isoliert perfundierten Nieren von Wildtyp- und AS<sup>-/-</sup>-Mäusen (bei konstantem Perfusionsdruck von 90 mmHg und in Gegenwart von 10 nmol/l Isoproterenol). Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von fünf Nieren pro Genotyp. (\*):  $p < 0,05$ ;



Sowohl in Wildtyp- als auch in AS<sup>-/-</sup>-Nieren konnte zudem der vasokonstriktorische Effekt von Angiotensin II beobachtet werden. Dieser zeigte sich in beiden Genotypen nach Angiotensin II-Zugabe in einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Perfusat-Fluss-Raten bei konstantem Perfusionsdruck von 90 mmHg (nach vorheriger Stimulierung der Renin-Sekretion mit 10 nmol/l Isoproterenol). In AS<sup>-/-</sup>-Nieren fanden sich dabei vor Zugabe von Angiotensin II im Vergleich zum Wildtyp um 20 % erhöhte Perfusat-Fluss-Raten (s. Abb. 3.18 B).

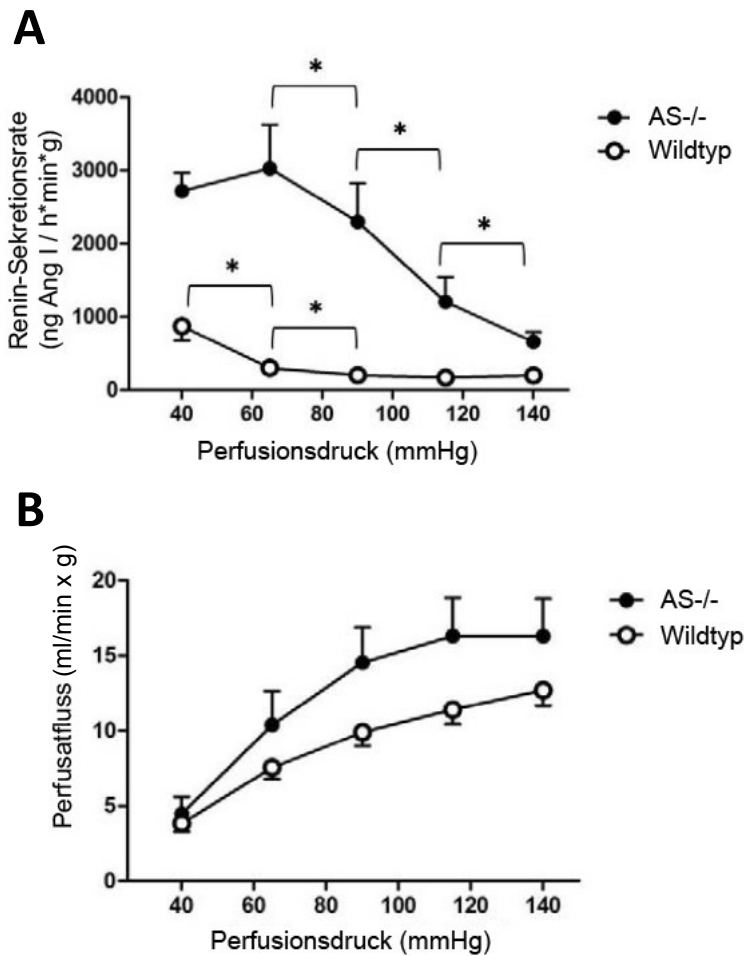
#### Variation des Perfusionsdrucks

Der renale Perfusionsdruck ist ein weiterer Regulator der Renins-Sekretion. Ein Abfall des Blutdrucks in der Niere führt zu einer verstärkten Freisetzung von Renin aus juxtaglomerulären Zellen. Der für die Druckmessung verantwortliche Sensor scheint dabei in der Niere selbst lokalisiert zu sein (Scholz *et al.*, 1994). Die genaue Wirkungsweise des renalen Barorezeptors ist allerdings nicht genau verstanden (Fray und Lush, 1976; Carey *et al.*, 1997).

Wie Abb. 3.19 A zeigt, konnte die inverse Beziehung zwischen Renin-Sekretionsrate und Perfusionsdruck für beide untersuchten Genotypen bestätigt werden. In Wildtyp-Nieren (in Gegenwart von 3 nmol/l Isoproterenol) zeigte sich ein durchschnittlicher Abfall der Renin-Sekretionsrate von 870 ng ANG I/h\*min\*g bei einem Perfusionsdruck von 40 mmHg auf 210 ng ANG I/h\*min\*g bei 140 mmHg. Auch in AS<sup>-/-</sup>-Nieren konnte man einen vom Perfusionsdruck abhängigen Abfall der Renin-Sekretionsrate feststellen. Diese fiel von 3050 ng ANG I/h\*min\*g bei 40 mmHg auf 650 ng ANG I/h\*min\*g bei 140 mmHg.

Unter den gegebenen Bedingungen waren die druckabhängigen Fluss-Raten in AS<sup>-/-</sup>-Nieren um bis zu 40 % höher als im Wildtyp (s. Abb. 3.19 B).

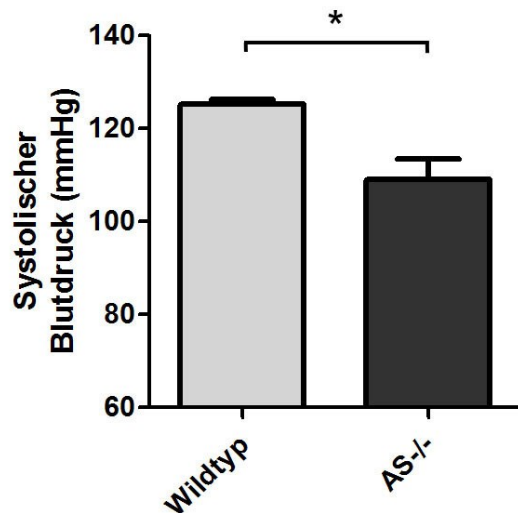




**Abb. 3.19: Auswirkung des Perfusionsdrucks auf Renin-Sekretion (A) und Perfusatfluss (B) in isoliert perfundierten Nieren von Wildtyp- und AS<sup>-/-</sup>-Mäusen.** Zunächst wurden die isolierten Nieren in Gegenwart von 3 nmol/l Isoproterenol bei konstantem Perfusionsdruck von 90 mmHg perfundiert. Der Druck wurde dann auf 40 mmHg reduziert und anschließend schrittweise um je 25 mmHg bis auf 140 mmHg erhöht. Jede Stufe dauerte dabei 5 min. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von fünf Nieren pro Genotyp. (\*):  $p < 0,05$ ;

### 3.1.3.3 Blutdruck

Der Blutdruck von  $AS^{-/-}$ -Mäusen ( $109,1 \pm 4,2$  mmHg) war im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen ( $125,2 \pm 0,9$  mmHg) signifikant erniedrigt (s. Abb. 3.20).



**Abb. 3.20: Systolischer Blutdruck von Wildtyp- und  $AS^{-/-}$ -Mäusen.** Die Daten stammen von 3 (Wildtyp) bzw. 4 ( $AS^{-/-}$ ) Tieren im Alter von 16 Wochen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM; (\*):  $p < 0,05$ ;

### 3.1.3.4 Zusammenfassung

Im Vergleich zum Wildtyp waren  $AS^{-/-}$  Mäuse hypotensiv und es ließ sich eine signifikant erhöhte Reninsekretion feststellen.

Diese ließ sich sowohl durch Gabe von Isoproterenol als auch durch Absenkung der extrazellulären Kalzium-Konzentration im gleichen Verhältnis wie im Wildtyp stimulieren.

Eine Inhibierung der Renin-Sekretion konnte genau wie im Wildtyp durch Zugabe von Angiotensin II oder durch Erhöhung des Perfusionsdrucks erreicht werden.

## 3.2 Charakterisierung Renin-produzierender Zellen in der AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup>-Maus

Wie bereits beschrieben (s. 3.1.2.7), zeichneten sich alle Renin-bildenden Zellen der AS<sup>-/-</sup>-Mäuse durch eine starke Produktion des Gap-Junction-Proteins Connexin 40 aus. Durch Cx40 gebildete Gap-Junctions verbinden die Reninzellen untereinander und stellen zudem eine Verbindung zu den benachbarten Mesangialzellen und Endothelzellen her. In Wildtyp-Mäusen wurde bereits gezeigt, dass das Vorhandensein dieser Gap-Junctions für die Funktion der Reninzellen von besonderer Bedeutung ist. Das Fehlen von Cx40 bewirkte hier, dass die Regulation der Reninsekretion nicht mehr im normalen Maße gesteuert werden konnte. In Cx40-defizienten Nieren ging charakteristischerweise die inverse Beziehung zwischen Perfusionsdruck und Renin-Sekretion verloren (Wagner *et al.*, 2007). Zudem zeigte sich, dass die Lokalisation der Renin-bildenden Zellen durch Cx40 beeinflusst wird. In Cx40-defizienten Mäusen fand man die Renin-bildenden Zellen nicht mehr innerhalb der afferenten Arteriole, sondern außerhalb der Gefäßwand im Bereich extraglomerulärer Mesangialzellen (Kurtz *et al.*, 2007).

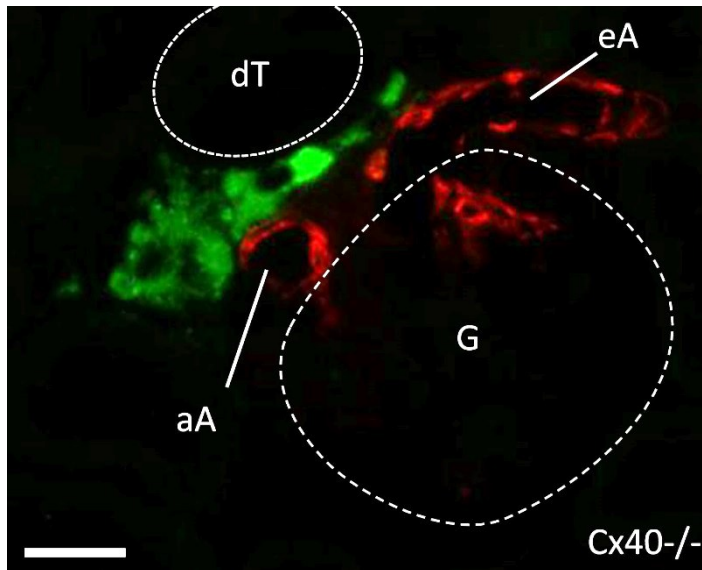
Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte mit Hilfe von AS-defizienten Mäusen, in denen das *Cx40*-Gen ausgeknockt war, überprüft werden, ob Cx40 für die perivaskulären Reninzellen die gleiche Relevanz besitzt wie für die juxtaglomerulären Zellen im Wildtyp. Zu diesem Zweck wurde in AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup>-Mäusen die altersabhängige Lokalisation sowie die Morphologie der perivaskulären Reninzellen analysiert und die Regulation der Reninsekretion überprüft.

### 3.2.1 Lokalisation und Morphologie

#### 3.2.1.1 Lokalisation

In Mäusen mit intaktem RAAS führt das Fehlen von Cx40 zu einer anormalen Lokalisation der Renin-produzierenden Zellen. Sobald keine durch Cx40 gebildeten Gap-Junctions mehr vorhanden sind, verlieren die Reninzellen ihre Positionierung in der *Media* der afferenten Arteriole. Stattdessen bilden sie große Felder außerhalb des Gefäßes im juxtaglomerulären Bereich. Die Anzahl der Reninzellen

pro Glomerulus ist im Vergleich zum Wildtyp erhöht, jedoch findet sich auch eine Vielzahl von Glomeruli in deren Umgebung gar keine Renin-produzierenden Zellen zu finden sind (Kurtz *et al.*, 2007) (s. Abb. 3.21).



**Abb. 3.21:** Immunfluoreszenzfärbung des Glomerulus einer Cx40<sup>-/-</sup>-Maus. Dargestellt ist die Immunfluoreszenz für Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot). Die Renin-positiven Zellen liegen alle außerhalb der Gefäße im Bereich des extraglomerulären Mesangiums. aA: Afferente Arteriole; eA: efferente Arteriole; G: Glomerulus; dT: distaler Tubulus; Maßstabsbalken: 20 µm;

Es sollte überprüft werden, ob Cx40 auch die Positionierung der Reninzellen in den perivaskulären Feldern der AS<sup>-/-</sup>-Maus beeinflusst. Zu diesem Zweck wurden Nierenschnitte von 10 Wochen alten AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup>-Mäusen immunhistochemisch mit Antikörpern gegen Renin und Glattmuskelaktin gefärbt und mit Nierenschnitten von gleichaltrigen AS<sup>-/-</sup>-Mäusen verglichen.

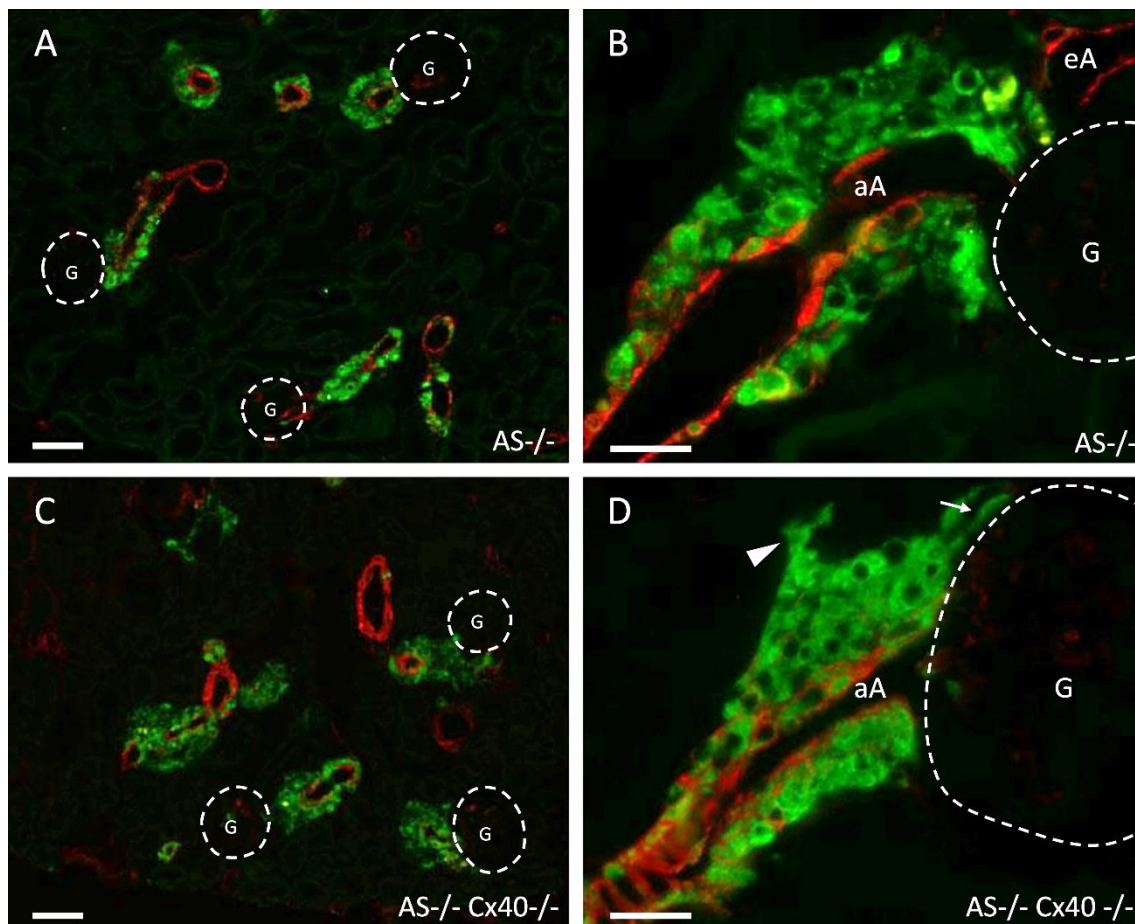
Es wurde deutlich, dass in AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup>-Mäusen eine ähnlich große Anzahl Renin-produzierender Zellen auftrat wie in der bereits beschriebenen AS<sup>-/-</sup>-Maus (s. Abb. 3.22).

Wie in AS<sup>-/-</sup>-Mäusen fand man auch in den Nieren von AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup>-Mäusen die Reninzellen in großer Anzahl lokalisiert um die präglomerulären Gefäße. Im Gegensatz zur unstimulierten Cx40<sup>-/-</sup>-Maus (Kurtz *et al.*, 2007) fand man Reninzellen auch in ihrer typischen Position innerhalb der *Media* der afferenten Arteriole (s. Abb. 3.22 C und D).

Es fanden sich in der AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup>-Niere jedoch auch einige Renin-positive Zellen, die sich von den perivaskulären Feldern aus in den tubulointerstitiellen Raum

ausbreiteten (gekennzeichnet durch Pfeilspitze in Abb. 3.22 D). Weiterhin zeigten sich zusätzliche Renin-positive Zellen im Bereich um die Bowman-Kapsel (gekennzeichnet durch Pfeil in Abb. 3.22 D). Beide Phänomene traten verstärkt mit zunehmendem Alter auf und werden unter 3.2.1.3.2 genauer beschrieben.

In der  $AS^{-/-}$ -Maus blieb dagegen die Renin-Expression auf die Zellen der manschettenartigen Felder beschränkt (s. Abb. 3.22 A und B)

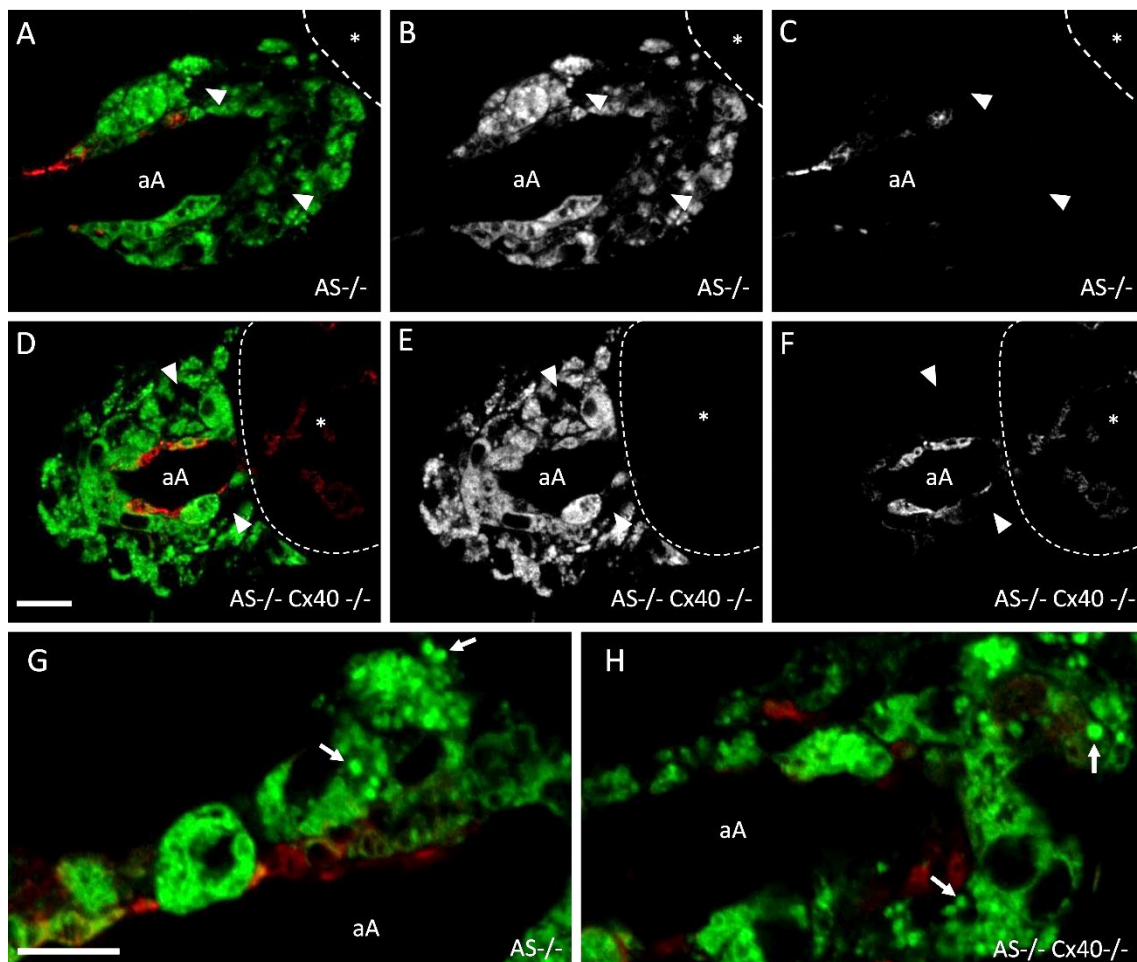


**Abb. 3.22: Immunfluoreszenzfärbung für Renin (grün) und Glutathione S-transferase (rot) im Nierenkortex von  $AS^{-/-}$ - und  $AS^{-/-}$  Cx40 $^{-/-}$ -Mäusen.** A und B zeigen den Nierenkortex einer  $AS^{-/-}$ -Maus in 100-facher (A) und 400-facher (B) Vergrößerung. C und D zeigen den Nierenkortex einer  $AS^{-/-}$  Cx40 $^{-/-}$ -Maus in 100-facher (C) und 400-facher (D) Vergrößerung. aA: Afferente Arteriole; eA: Efferente Arteriole; G: Glomerulus; Pfeilspitze: Ausbreitung Renin-positiver Zellen in den tubulointerstitiellen Raum; Pfeil: Renin-positive Zellen im Bereich der Bowman-Kapsel; Maßstabsbalken: 50  $\mu$ m (A und C); 20  $\mu$ m (B und D);

### 3.2.1.2 Morphologie

Mit Hilfe konfokaler Mikroskopie sollte die Morphologie der perivaskulären Zellen in  $AS^{-/-}$  Cx40 $^{-/-}$ -Mäusen genauer analysiert und mit den Reninzellen der  $AS^{-/-}$ -Maus verglichen werden. Dazu wurden Nierenschnitte von 10 Wochen alten Mäusen betrachtet.

Wie Abb. 3.23 zeigt, fanden sich keine Unterschiede zu den bereits unter 3.1.1.2 beschriebenen perivaskulären Zellen von  $AS^{-/-}$ -Mäusen. Wie diese zeigten auch die  $AS^{-/-}$   $Cx40^{-/-}$ -Mäuse Reninzellfelder mit vollständig ausdifferenzierten kuboiden Reninzellen, die reich an Renin-positiven Vesikeln waren (gekennzeichnet durch Pfeile in Abb. 3.23 G und H). Es fanden sich wie in der  $AS^{-/-}$ -Maus innerhalb der perivaskulären Zellfelder Reninzellen mit deutlich geringerer Reninproduktion (gekennzeichnet durch Pfeilspitzen in Abb. 3.23 D-F). Eine Zunahme an Glattmuskelaktin war in diesen Zellen jeweils nicht zu beobachten.



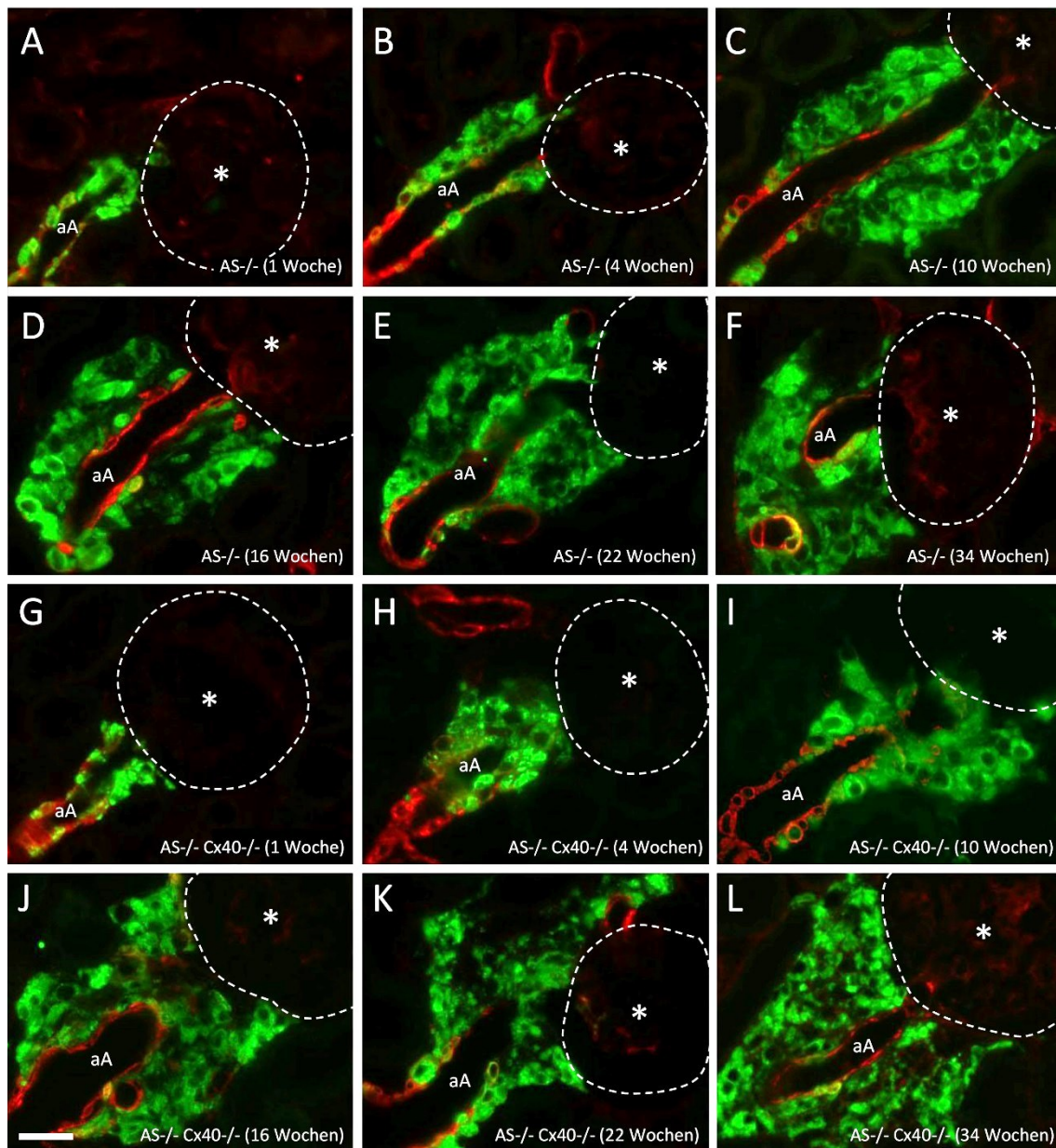
**Abb. 3.23:** Konfokalmikroskopische Aufnahmen der afferenten Arteriole von  $AS^{-/-}$  (A-C; G) und  $AS^{-/-}$   $Cx40^{-/-}$  Mäusen (D-F; H). Dargestellt ist die immunhistochemische Färbung von Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot). Bild B und E zeigen Renin-Fluoreszenz allein. Bild C und F zeigen Glattmuskelaktin-Fluoreszenz allein. Die übrigen Bilder zeigen eine Überlagerung von Renin- und Glattmuskelaktin-Fluoreszenz. Pfeilspitzen: Renin-arme perivaskuläre Zellen; Pfeile: Renin-positive Vesikel; aA: Afferente Arteriole; (\*): Glomerulus; Maßstabsbalken: 10  $\mu$ m;



### 3.2.1.3 Altersabhängige Veränderungen

#### 3.2.1.3.1 Veränderungen der Reninzell-Anzahl

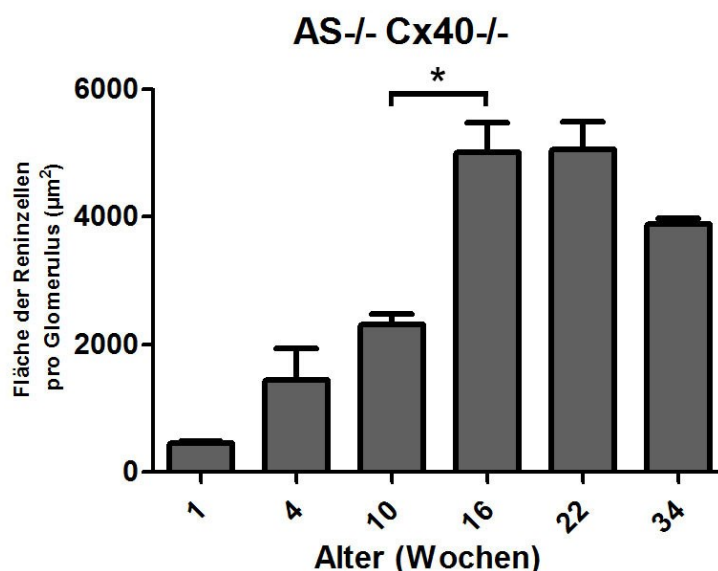
Um altersabhängige Veränderungen der Reninzellen zu erkennen, wurden die Nieren von  $AS^{-/-}$   $Cx40^{-/-}$ -Mäusen im Alter von 1, 4, 10, 16, 22, und 34 Wochen untersucht und mit Nieren von gleichaltrigen  $AS^{-/-}$ -Mäusen verglichen.



**Abb. 3.24: Altersabhängige Veränderungen der Anzahl Renin-produzierender Zellen in  $AS^{-/-}$  und  $AS^{-/-}$   $Cx40^{-/-}$  Niere.** Dargestellt ist die immunhistochemische Färbung von Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot). A-F: Renin-produzierende Zellen unterschiedlicher Altersstadien (1-34 Wochen) in der  $AS^{-/-}$ -Maus. G-L: Renin-produzierende Zellen unterschiedlicher Altersstadien (1-34 Wochen) in der  $AS^{-/-}$   $Cx40^{-/-}$ -Maus. aA: Afferente Arteriole; (\*): Glomerulus; Maßstabsbalken: 20  $\mu$ m;

Der Vergleich verschiedener Altersstadien machte deutlich, dass die Anzahl der Renin-produzierenden Zellen pro Glomerulus mit zunehmendem Alter anstieg (s. Abb. 3.24 G-L). Unter diesem Aspekt glichen die  $AS^{-/-} Cx40^{-/-}$ -Mäuse den  $AS^{-/-}$ -Mäusen (s. Abb. 3.24 A-F).

Die Ausmessung der Fläche der juxtaglomerulären Reninzellfelder bestätigte die konstante altersabhängige Zunahme der Anzahl an Renin-positiven Zellen in der  $AS^{-/-} Cx40^{-/-}$ -Maus bis zu einem Alter von 16 Wochen. Die Fläche der Renin-positiven Felder stieg von ca. 500  $\mu m^2$  bei einer Woche alten Tieren auf einen Wert um 5000  $\mu m^2$  für 16-34 Wochen alte Tiere (s. Abb. 3.25). Diese Werte entsprachen denen der  $AS^{-/-}$ -Maus (s. Abb. 3.5 B)



**Abb. 3.25: Fläche Renin-positiver Zellen pro Glomerulus in  $AS^{-/-} Cx40^{-/-}$ -Mäusen zu verschiedenen Altersstadien (1-34 Wochen).** Pro Zeitpunkt wurden je drei Tiere analysiert. Der Wert für jedes einzelne Tier ergab sich aus der Vermessung von je 15-20 Glomeruli. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM; (\*):  $p < 0,05$ ;

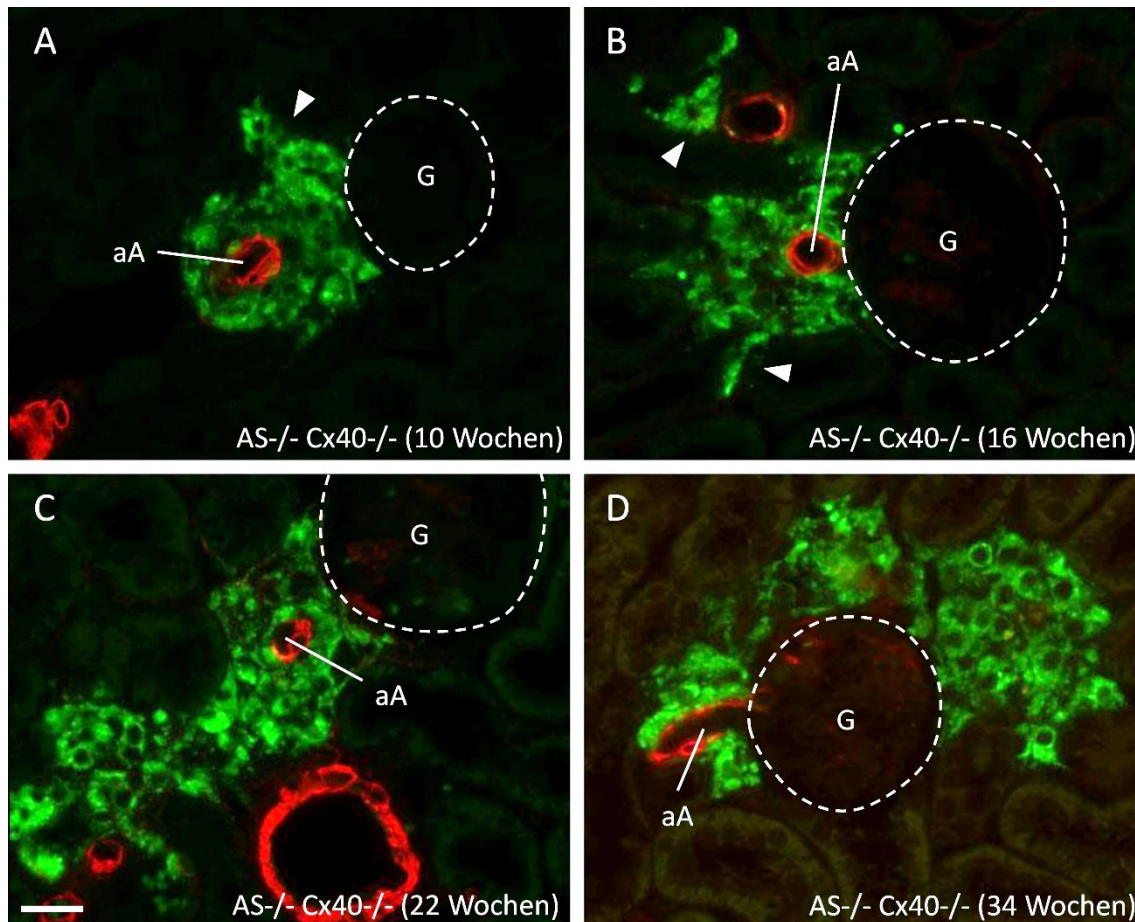
### 3.2.1.3.2 Unterschiede zur $AS^{-/-}$ -Maus

Mit zunehmendem Alter fanden sich in der  $AS^{-/-} Cx40^{-/-}$ -Maus im Gegensatz zur  $AS^{-/-}$ -Maus Renin-positive Zellen, deren Lokalisation nicht mehr auf die manschettenartigen Felder um die afferente Arteriole begrenzt war. Es konnten zwei unterschiedliche Phänomene beobachtet werden:

a) Ausbreitung Renin-positiver Zellen in den tubulointerstitiellen Raum: Es fand eine Ausbreitung Renin-produzierender Zellen in den tubulointerstitiellen Raum



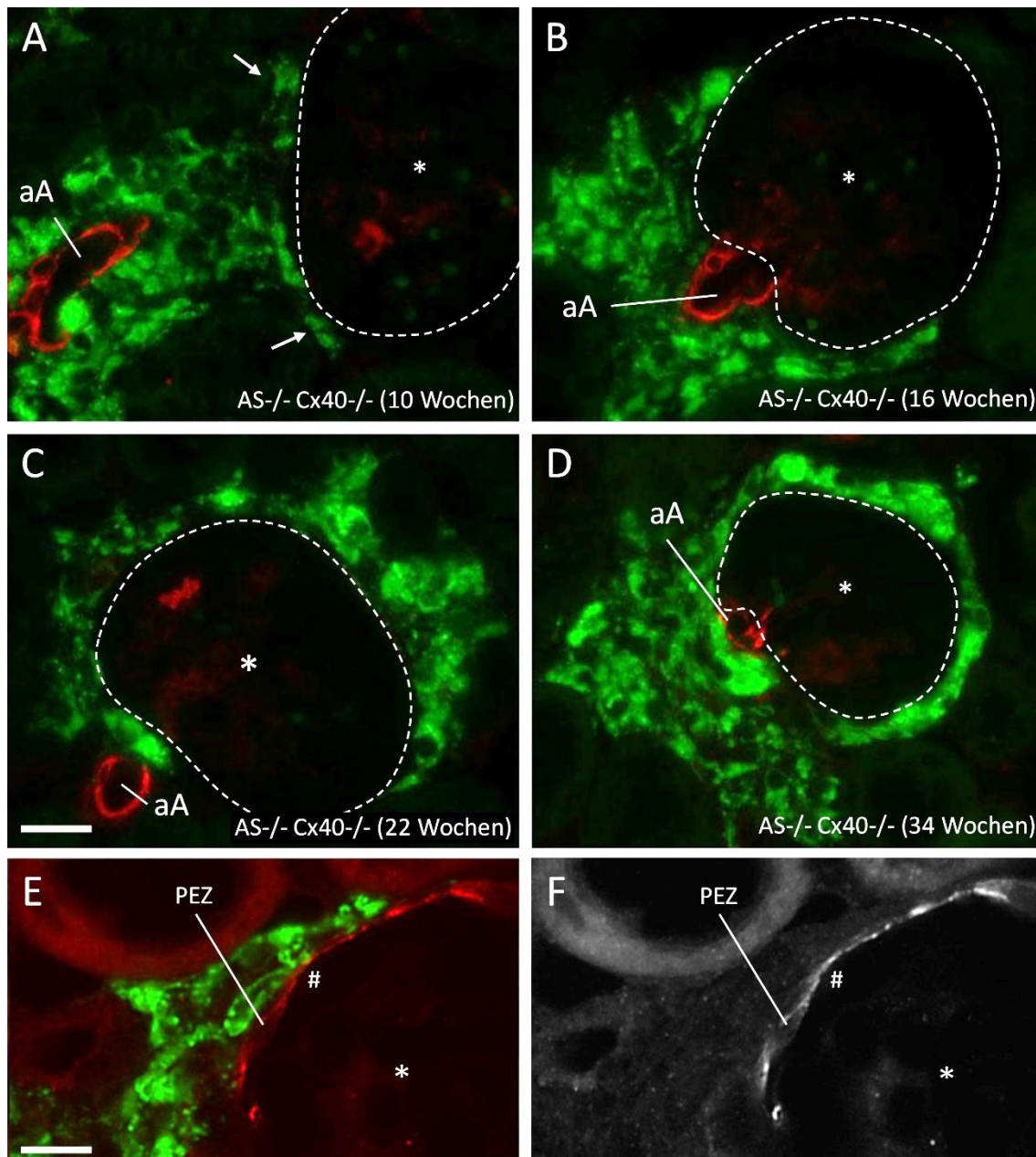
statt. Bereits bei 10 Wochen alten Tieren fanden sich wenige Renin-positive Zellen im interstitiellen Bereich zwischen den an die Reninzellfelder angrenzenden Tubuli (gekennzeichnet durch Pfeilspitze in Abb. 3.26 A). In älteren Nierenstadien wurde die Anzahl der interstitiellen Reninzellen größer und es bildeten sich zum Teil ausgedehnte Zellfelder in großem Abstand zur afferenten Arteriole. Der Kontakt der Reninzellen untereinander und damit auch zur afferenten Arteriole ging allerdings nie verloren (s. Abb. 3.26).



**Abb. 3.26: Altersabhängige Ausbreitung Renin-produzierender Zellen in den tubulointerstitiellen Raum in der  $AS^{-/-} Cx40^{-/-}$ -Niere.** Dargestellt ist die immunohistochemische Färbung von Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot). Mit zunehmendem Alter zeigt sich eine vermehrte Ausbreitung Renin-produzierender Zellen in den tubulointerstitiellen Raum. aA: Afferente Arteriole; G: Glomerulus; Pfeilspitzen: Beginnende Ausbreitung Renin-positiver Zellen in den tubulointerstitiellen Raum; Maßstabsbalken: 20  $\mu$ m;

b) Renin-positive Zellen im Bereich der Bowmankapsel: Ein zweites Phänomen, das nur in den  $AS^{-/-} Cx40^{-/-}$ -Mäusen beobachtet werden konnte, waren Renin-positive Zellen im Bereich der Bowman-Kapsel. Im Alter von 10 Wochen fanden sich diese Zellen nur nahe des vaskulären Pols (gekennzeichnet durch Pfeile in Abb. 3.27 A), in späteren Altersstadien umschlossen diese jedoch zum Teil den

gesamten Glomerulus (s. Abb. 3.27 A-D). Um zu untersuchen, ob es sich dabei um die parietalen Epithelzellen der Bowman-Kapsel handelt, wurde Renin zusammen mit Claudin 1 gefärbt, welches von den parietalen Epithelzellen exprimiert wird. Hier zeigte sich keine Ko-Färbung von Renin und Claudin 1. Die Claudin 1-positiven Epithelzellen liegen noch zwischen den Renin-positiven Zellen und dem Lumen der Bowman-Kapsel (s. 3.27 E und F).

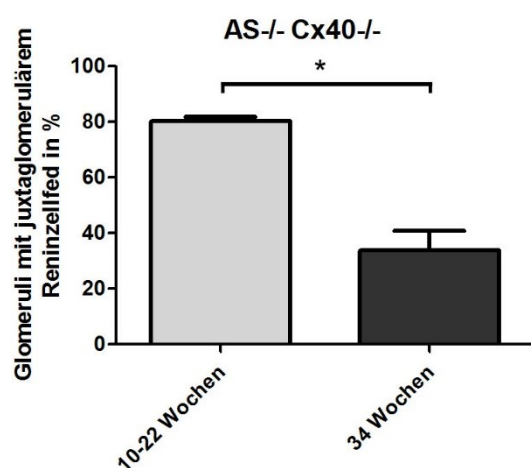


**Abb. 3.27: Altersabhängige Ausbreitung Renin-produzierender Zellen im Bereich der Bowman-Kapsel in der AS-/Cx40<sup>-/-</sup>-Niere.** Bild A-D: Immunhistochemische Färbung von Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot). Mit zunehmendem Alter (10-34 Wochen) zeigen sich vermehrt Renin-positive Zellen im Bereich der Bowman-Kapsel. Bild E: Immunhistochemische Färbung von Renin (grün) und Claudin 1 (rot). Es ist keine Kolokalisation von Renin und Claudin 1 festzustellen. Bild F zeigt Claudin 1-Färbung allein. aA: Afferente Arteriole; (\*): Glomerulus; Pfeil: Beginnende Ausbreitung Renin-positiver Zellen um die Bowman-Kapsel; PEZ: Parietale Epithelzellen; (#): Lumen der Bowman-Kapsel; Maßstabsbalken: 20 µm;

Die beiden beschriebenen Effekte waren nicht an allen Glomeruli gleich stark zu beobachten. Nur an etwa 5 % der untersuchten Glomeruli von 34 Wochen alten  $AS^{-/-} Cx40^{-/-}$ -Tieren fanden sie sich in voller Ausprägung.

Bei der Betrachtung 34 Wochen alter  $AS^{-/-} Cx40^{-/-}$ -Mäuse konnte man einen weiteren Unterschied zu  $AS^{-/-}$ -Mäusen feststellen:

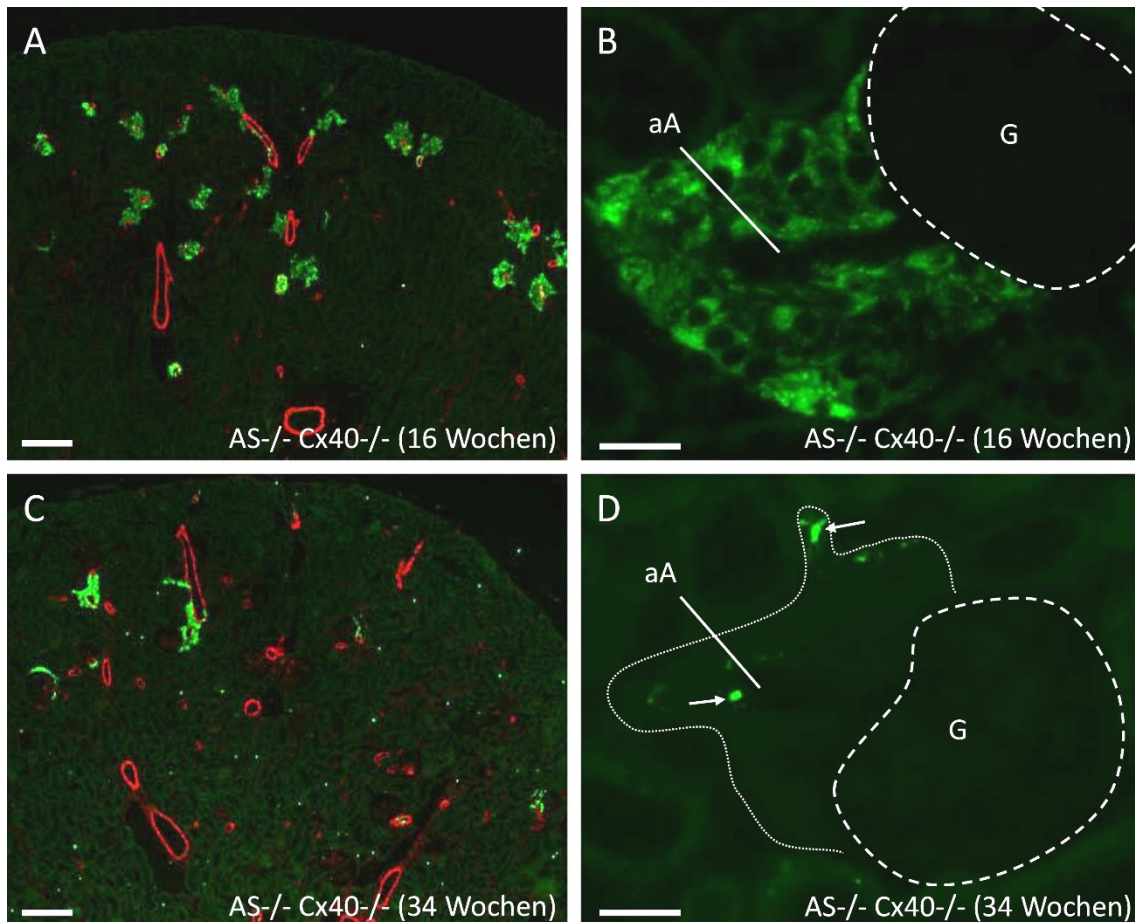
In 34 Wochen alten  $AS^{-/-} Cx40^{-/-}$ -Mäusen zeigte sich im Vergleich zu jüngeren Altersstadien ein deutlicher Rückgang der Renin-Produktion. Dieser machte sich sowohl in erniedrigten Renin-mRNA-Werten (s. 3.2.1.3.3) als auch in einer Abnahme der Anzahl Renin-produzierender Zellen bemerkbar. Offensichtlich fand der Rückgang Renin-produzierender Zellen in 34 Wochen alten  $AS^{-/-} Cx40^{-/-}$ -Mäusen aber nicht an allen Glomeruli gleichermaßen statt. Während sich an einigen Glomeruli weiterhin ausgedehnte Reninzellfelder zeigten, die sich in ihrer durchschnittlichen Fläche kaum von denen 16-22 Wochen alter Tiere unterschieden (s. Abb. 3.25), befanden sich an anderen Glomeruli offenbar gar keine Renin-produzierenden Zellen mehr. In Nierenschnitten von 34 Wochen alten  $AS^{-/-} Cx40^{-/-}$ -Mäusen fanden sich so nur an 34 % der untersuchten Glomeruli Renin-positive Zellfelder, während es bei 16-22 Wochen alten Tieren 80 % waren (s. 3.28 und 3.29 A und C).



**Abb. 3.28: Prozentualer Anteil von Glomeruli mit angrenzendem Reninzellfeld.** Die Daten stammen von 15 (10-22 Wochen) bzw. vier (34 Wochen) Tieren pro Gruppe, von denen auf Renin-gefärbten Nierenschnitten je ca. 60-120 Glomeruli ausgezählt wurden. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM; (\*):  $p < 0,05$ ;



Eine genauere Betrachtung der übrigen Glomeruli in 34 Wochen alten  $AS^{-/-}$   $Cx40^{-/-}$ -Mäusen machte jedoch deutlich, dass die Renin-produzierenden Zellen hier nicht verschwunden waren. Die Renin-Synthese in diesen Zellen war allerdings scheinbar auf ein Minimum heruntergefahren, wie eine noch erkennbare Rest-Fluoreszenz des Renin-spezifischen Antikörpers zeigte (gekennzeichnet durch Pfeile in Abb. 3.29 D). Eine genauere Charakterisierung dieser Renin-armen Zellen erfolgt unter 3.2.2.8.



**Abb. 3.29: Immunfluoreszenzfärbung für Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot) im Nierenkortex von  $AS^{-/-}$   $Cx40^{-/-}$ -Mäusen im Alter von 16 und 34 Wochen.** A und B zeigen den Nierenkortex einer 16 Wochen alten  $AS^{-/-}$   $Cx40^{-/-}$ -Maus in 100-facher (A) und 400-facher (B) Vergrößerung. C und D zeigen den Nierenkortex einer 34 Wochen alten  $AS^{-/-}$   $Cx40^{-/-}$ -Maus in 100-facher (C) und 400-facher (D) Vergrößerung. In 34 Wochen alten Tieren finden sich vermehrt Renin-negative perivaskuläre Zellfelder an den Glomeruli. aA: Afferente Arteriole; G: Glomerulus; Pfeil: Renin-Fluoreszenz; Die dünne Linie in Bild D umrahmt ein Renin-negatives perivaskuläres Feld. Maßstabsbalken: 50 µm (A und C); 20 µm (B und D);

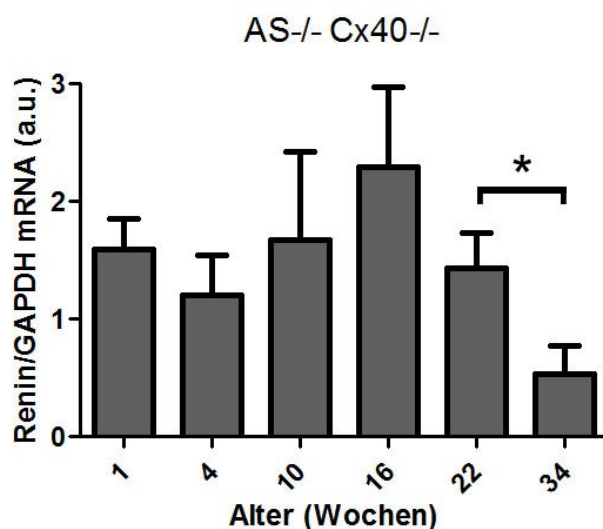
### 3.2.1.3.3 Totale Renin-mRNA-Abundanz

Neben der immunhistochemischen Analyse der Reninzellanzahl wurde auch die totale Renin-mRNA in  $AS^{-/-}$   $Cx40^{-/-}$ -Nieren altersabhängig untersucht. Im Alter von

1, 4, 10, 16, 22 und 34 Wochen wurde der Renin-mRNA-Gehalt mittels quantitativer Echtzeit-PCR bestimmt.

Es zeigten sich hier keine signifikanten Unterschiede in der gemessenen renalen Renin-mRNA für die Altersstadien von 1-22 Wochen. In 34 Wochen alten Nieren war jedoch die Renin mRNA im Vergleich zum Durchschnitt der übrigen Altersstadien etwa um den Faktor 3 erniedrigt (s. Abb. 3.30).

Die totale Renin-mRNA-Abundanz in den Nieren von 1-22 Wochen alten AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup>-Mäusen unterschied sich nicht signifikant von gleichaltrigen AS<sup>-/-</sup>-Mäusen (s. Abb. 3.6 B).



**Abb. 3.30:** Renale Renin-mRNA-Abundanz in AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup>-Mäusen zu verschiedenen Altersstadien (1-34 Wochen). Die Daten stammen von 4-10 Tieren je Alterstadium und Genotyp. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM; (\*):  $p < 0,05$ ;

#### 3.2.1.4 Zusammenfassung

Wie in der AS<sup>-/-</sup>-Maus steigt auch in der AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup>-Maus die Anzahl der Renin-positiven Zellen pro Glomerulus mit zunehmendem Alter und erreicht ihr Maximum nach 16-22 Wochen. Die Anzahl der Reninzellen entspricht der in AS<sup>-/-</sup>-Mäusen. Im Gegensatz zur AS<sup>-/-</sup>-Maus finden sich Renin-positive Zellen in älteren AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup>-Tieren auch im tubulointerstitiellen Bereich und im Bereich der Bowman-Kapsel. Im ältesten untersuchten Altersstadium von 34 Wochen finden sich zudem viele juxtaglomeruläre Zellfelder mit drastisch verringerter Renin-Fluoreszenz.

### 3.2.2 Charakterisierung Renin-produzierender Zellen in AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup>-Mäusen durch Nachweis von Zellmarker-Proteinen

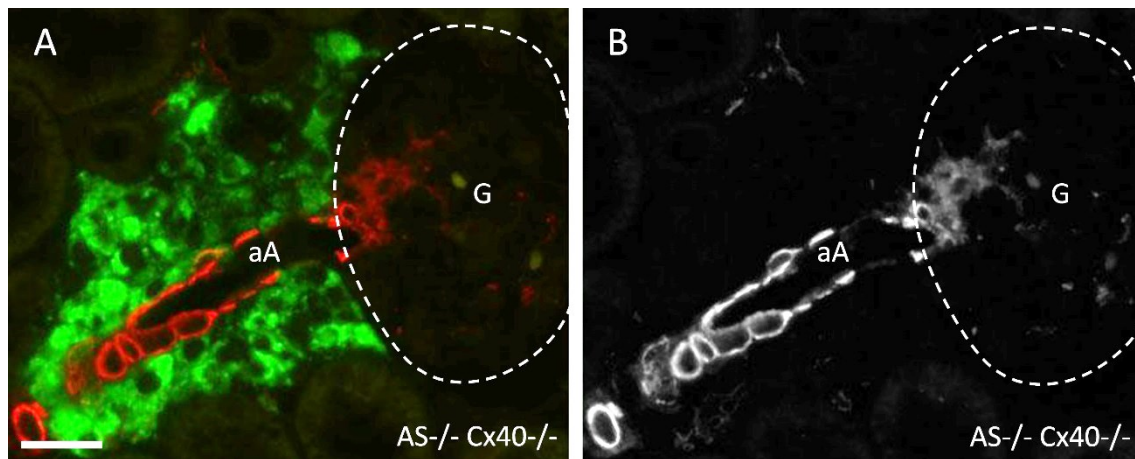
Zur genaueren Charakterisierung der Renin-produzierenden Zellen wurde auch in AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup>-Mäusen die Expression der unter 3.1.2 beschriebenen Zellmarker-Proteine überprüft.

#### 3.2.2.1 Glattmuskelaktin

Glattmuskelaktin zeigte sich in den glatten Muskelzellen der arteriellen Gefäße. In der afferenten Arteriole fand es sich in nahezu allen Zellen. Nur wenige voll ausdifferenzierte Reninzellen in der afferenten Arteriole besaßen kein Glattmuskelaktin.

In den Reninzellen der perivaskulären Felder ließ sich dagegen kaum Glattmuskelaktin nachweisen.

Zusätzlich zeigte sich schwache Glattmuskelaktin-Expression im intraglomerulären Mesangium (s. Abb. 3.31).

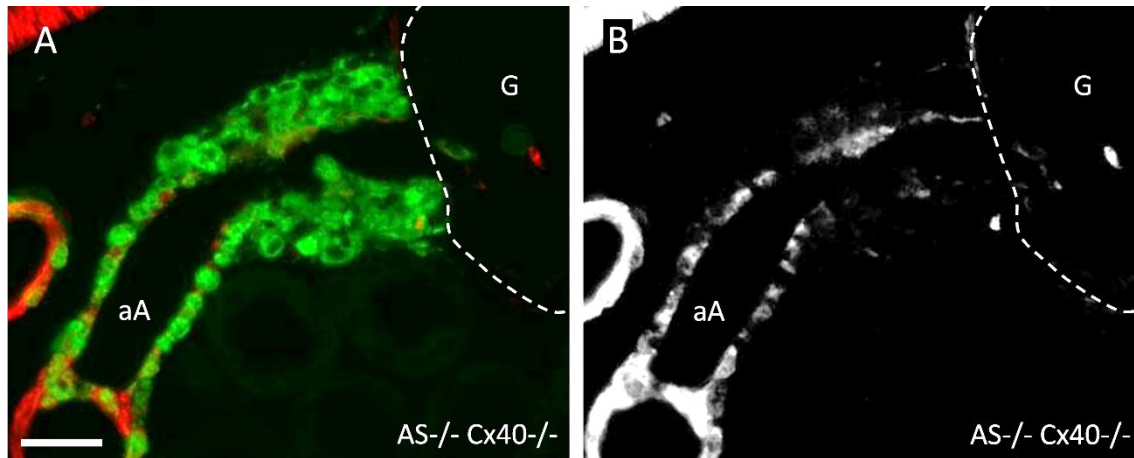


**Abb. 3.31:** Immunfluoreszenzfärbung für Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot) in AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup> Mäusen. aA: Afferente Arteriole; G: Glomerulus; Maßstabsbalken: 20 µm;

#### 3.2.2.2 Sm22

Wie Abb. 3.32 zeigt, fand sich Sm22-Fluoreszenz in den glatten Muskelzellen der arteriellen Gefäße. Im Bereich der Intermediärzellen der afferenten Arteriole war Sm22 weniger stark ausgeprägt aber immer noch zu erkennen.

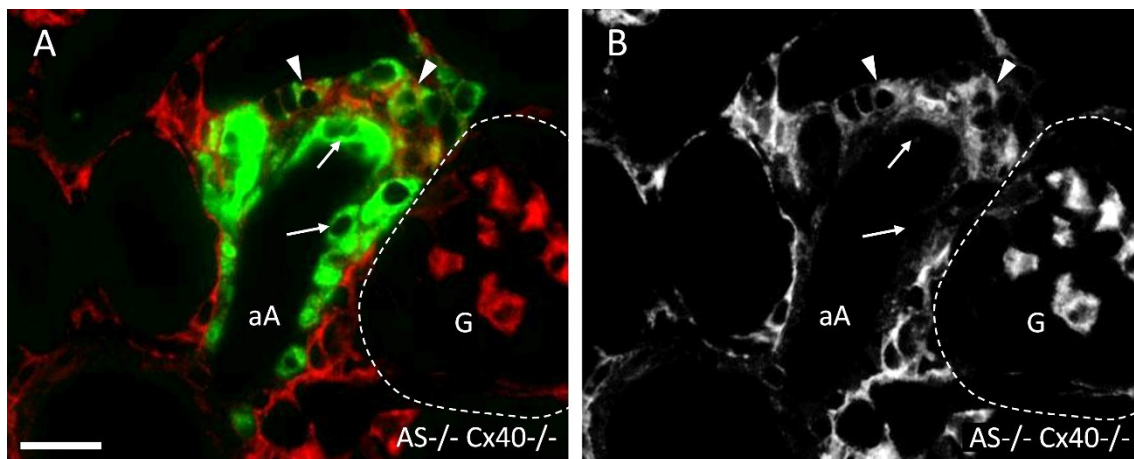
Im Bereich der perivaskulären Reninzellen ließ sich dagegen keine Sm22-Fluoreszenz nachweisen.



**Abb. 3.32:** Immunfluoreszenzfärbung für Renin (grün) und Sm22 (rot) in  $AS^{-/-}$   $Cx40^{-/-}$ -Mäusen. aA: Afferente Arteriole; G: Glomerulus; Maßstabsbalken: 20  $\mu$ m;

### 3.2.2.3 PDGF-Rezeptor- $\beta$

Innerhalb der Gefäße fand sich keine PDGF-Rezeptor- $\beta$ -Färbung. Auch in vaskulären Reninzellen ließ sich PDGF-Rezeptor- $\beta$  nicht feststellen (beispielhafte Zellen gekennzeichnet durch Pfeile in Abb. 3.33).



**Abb. 3.33:** Immunfluoreszenzfärbung für Renin (grün) und PDGF-Rezeptor- $\beta$  (rot) in  $AS^{-/-}$   $Cx40^{-/-}$ -Mäusen. aA: Afferente Arteriole; G: Glomerulus; Pfeilspitzen: Perivaskuläre Reninzellen; Pfeile: Vaskuläre Reninzellen; Maßstabsbalken: 20  $\mu$ m;

In den Zellen der perivaskulären Reninzell-Felder fand sich dagegen PDGF-Rezeptor  $\beta$ -Fluoreszenz (beispielhafte Zellen gekennzeichnet durch Pfeilspitzen in Abb. 3.33).

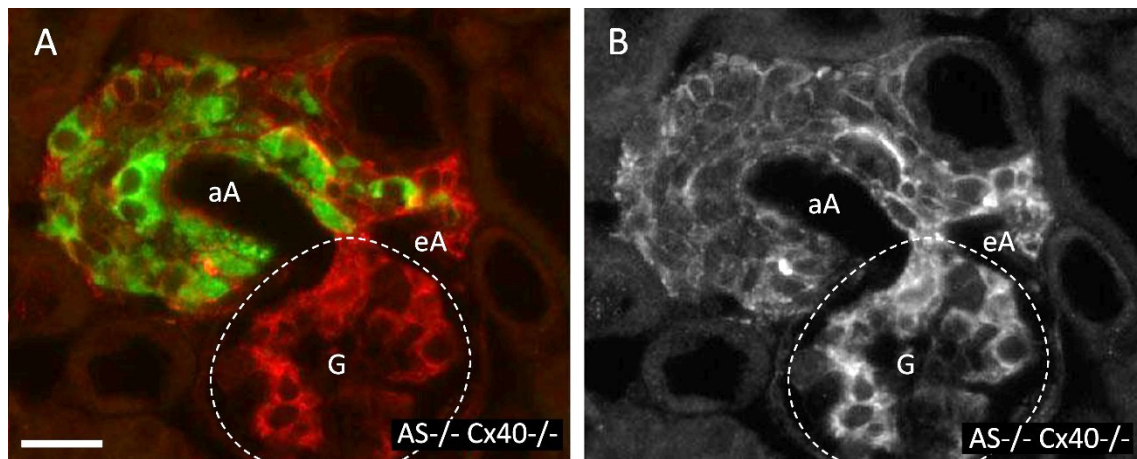


Am stärksten ließ sich PDGF-Rezeptor- $\beta$  im Interstitium und in intraglomerulären Mesangialzellen nachweisen (s. Abb. 3.33)

#### 3.2.2.4 NG2

NG2-Färbung fand sich in allen Renin-positiven Zellen. Am stärksten zeigte sich die Expression von NG2 jedoch in Renin-positiven Zellen im Bereich des extraglomerulären Mesangiums zwischen afferenter und efferenter Arteriole.

Starke NG2-Fluoreszenz zeigte sich weiterhin in den glatten Muskelzellen der Gefäße sowie im intraglomerulären Mesangium (s. Abb. 3.34)



**Abb. 3.34:** Immunfluoreszenzfärbung für Renin (grün) und NG2 (rot) in  $AS^{-/-} Cx40^{-/-}$ -Mäusen. aA: Afferente Arteriole; eA: Efferente Arteriole; G: Glomerulus; Maßstabsbalken: 20  $\mu m$ ;

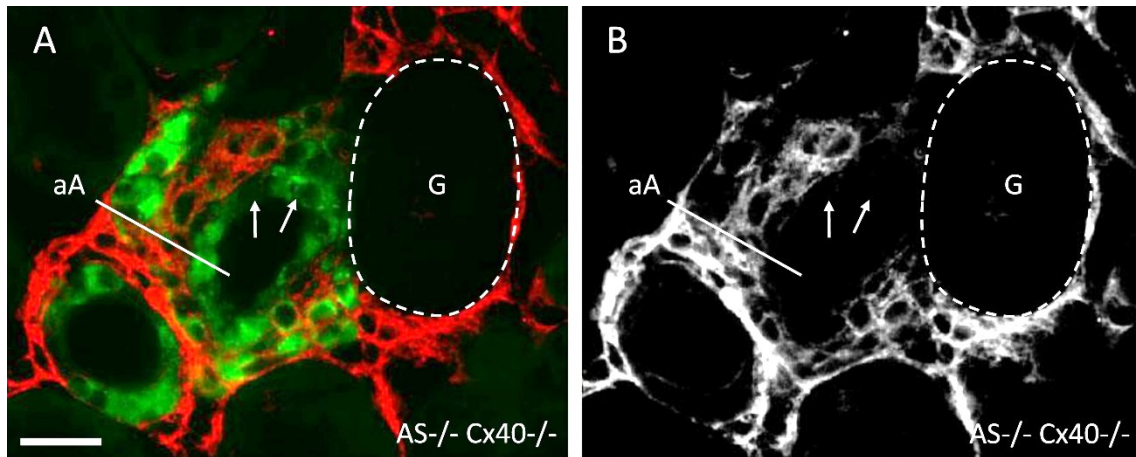
#### 3.2.2.5 Kollagen I

Vaskuläre Reninzellen sowie glatte Muskelzellen der Gefäße zeigten keine Produktion von Kollagen I (exemplarische Zellen gekennzeichnet durch Pfeile in Abb. 3.35).

In den perivaskulären Feldern fand sich im Gegensatz dazu starke Kollagen I-Fluoreszenz.

Auch im Interstitium fand sich reichhaltiges Kollagen I.





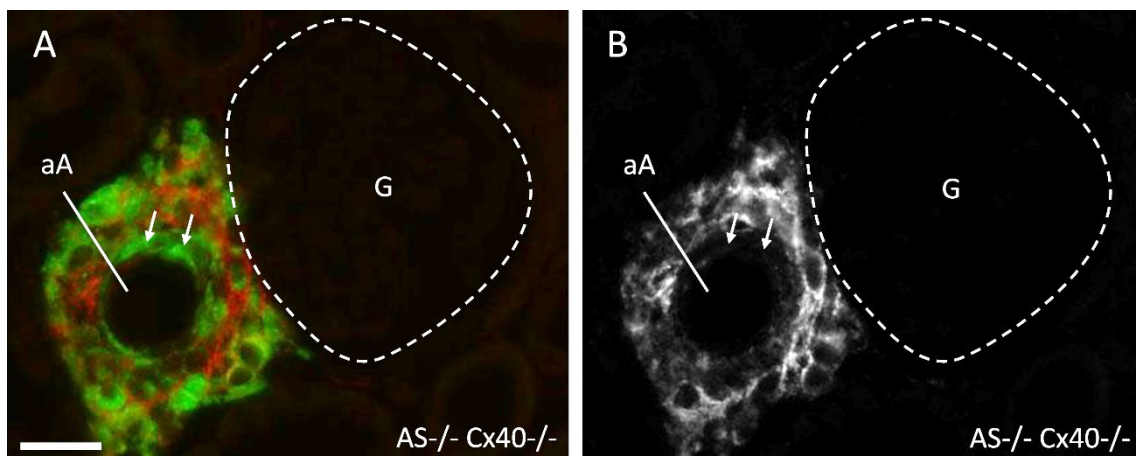
**Abb. 3.35:** Immunfluoreszenzfärbung für Renin (grün) und Kollagen I (rot) in  $AS^{-/-} Cx40^{-/-}$ -Mäusen. aA: Afferente Arteriole; G: Glomerulus; Pfeile: Vaskuläre Reninzellen; Maßstabsbalken: 20  $\mu m$ ;

### 3.2.2.6 Prokollagen I

Immunhistochemisch nachweisbares Prokollagen I fand sich einzig im Bereich Renin-positiver Zellen.

In den vaskulären Reninzellen ließ sich allerdings keine eindeutige Prokollagen I-Fluoreszenz finden (exemplarische Zellen gekennzeichnet durch Pfeile in Abb. 3.36).

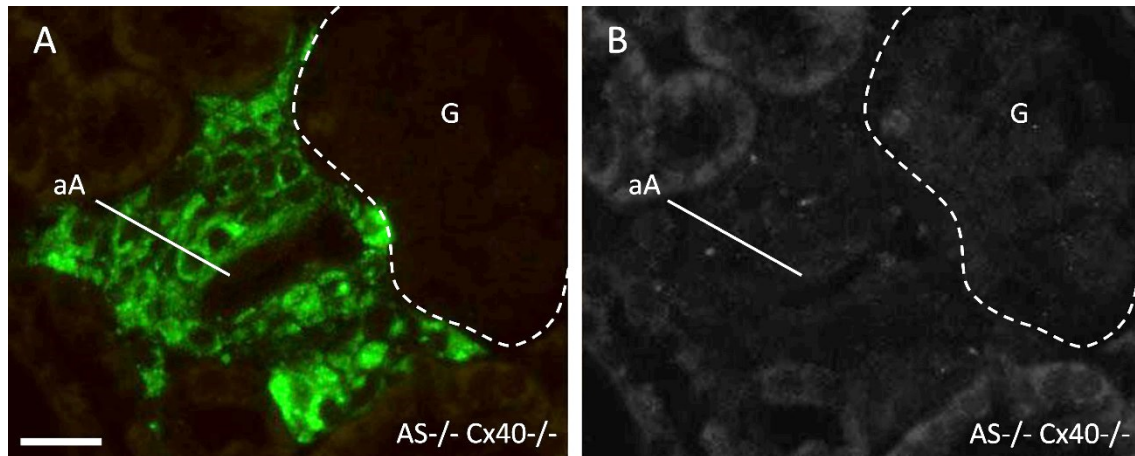
Im Bereich der perivaskulären Reninzellen war das Signal dagegen deutlich stärker (s. Abb. 3.36). Auffälligerweise ließ sich hier Prokollagen I in Renin-armen Zellen deutlicher nachweisen als in Zellen mit starker Renin-Produktion.



**Abb. 3.36:** Immunfluoreszenzfärbung für Renin (grün) und Prokollagen I (rot) in  $AS^{-/-} Cx40^{-/-}$ -Mäusen. aA: Afferente Arteriole; G: Glomerulus; Pfeile: Vaskuläre Reninzellen; Maßstabsbalken: 20  $\mu m$ ;

### 3.2.2.7 Connexin 40

In  $AS^{-/-}$   $Cx40^{-/-}$ -Mäusen ließ sich Connexin 40 immunhistochemisch nicht nachweisen (s. Abb. 3.37).



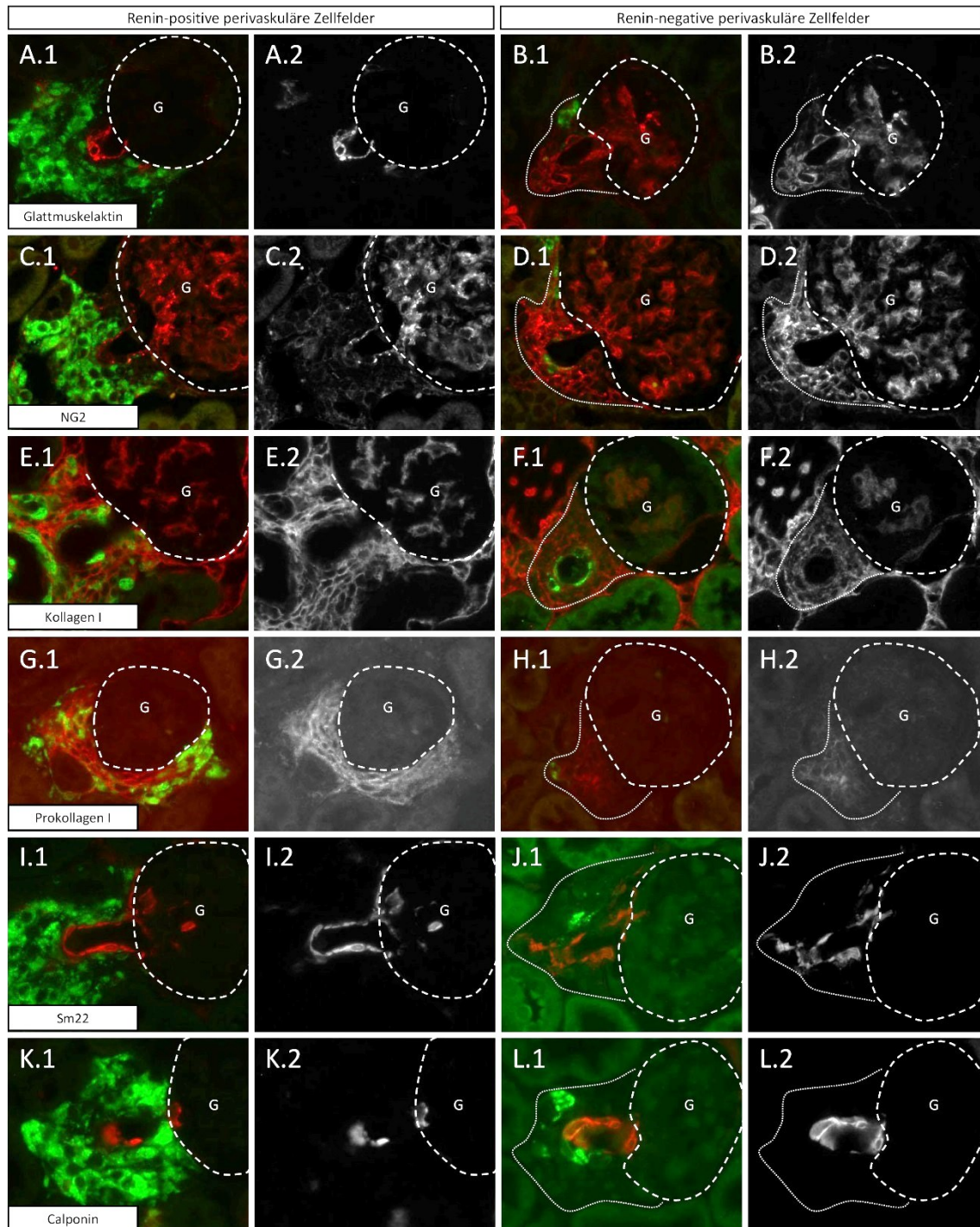
**Abb. 3.37:** Immunfluoreszenzfärbung für Renin (grün) und Connexin 40 (rot) in  $AS^{-/-}$   $Cx40^{-/-}$ -Mäusen. aA: Afferente Arteriole; G: Glomerulus; Maßstabsbalken: 20  $\mu$ m;

### 3.2.2.8 Charakterisierung Renin-armer perivaskulärer Zellen

Wie unter 3.2.1.3.2 beschrieben fanden sich in 34 Wochen alten  $AS^{-/-}$   $Cx40^{-/-}$ -Mäusen neben den typischen perivaskulären Reninzellfeldern auch Zellfelder in denen die Renin-Produktion drastisch zurückgefahren war. Um die Renin-armen perivaskulären Zellen der 34 Wochen alten  $AS^{-/-}$   $Cx40^{-/-}$ -Mäuse genauer zu charakterisieren, wurde auch hier die Expression verschiedener Markerproteine untersucht (s. Abb. 3.38).

Es stellte sich heraus, dass in den nahezu Renin-negativen Zellfeldern vermehrt Glattmuskelaktin produziert wurde. Für das Auftreten von Glattmuskelaktin in den Renin-positiven Zellfeldern fanden sich dagegen keine Anzeichen (s. Abb. 3.38 A und B). Weiterhin ließ sich in den Renin-armen Feldern eine im Vergleich deutlich erhöhte Produktion des Proteoglykans NG2 feststellen (s. Abb. 3.38 C und D). Kollagen I-Expression, wie man sie in den Renin-positiven Zellfeldern feststellte, fand man nicht im gleichen Maß in den Renin-negativen perivaskulären Zellen. Hier war nur ein deutlich abgeschwächtes Kollagen I-Signal zu beobachten (s. Abb. 3.38 E und F). Gleiches galt auch für die Produktion von Prokollagen I, die im Bereich der Renin-armen Zellen nur noch schwach zu erkennen war. (s. Abb. 3.38 G und H). Die Glattmuskelzellmarker Sm22 und Calponin fanden sich weder im

Bereich der Renin-positiven noch im Bereich der Renin-negativen Felder, sondern einzig innerhalb der afferenten Arteriole. (s. Abb. 3.38 I und J sowie K und L).



**Abb. 3.38: Immunfluoreszenzfärbung Renin-positiver und Renin-negativer perivaskulärer Zellfelder in 34 Wochen alten  $AS^{-/-}$   $Cx40^{-/-}$ -Mäusen.** Dargestellt ist je eine Ko-Färbung von Renin mit Glattmuskelaktin (A, B), NG2 (C, D), Kollagen I (E, F), Prokollagen I (G, H), Sm22 (I, J) und Calponin (K, L). Renin ist in grün dargestellt, die Zellmarker in rot. Neben dem Mischbild wird der jeweilige Zellmarker auch einzeln in schwarz-weiß gezeigt. G: Glomerulus; Die Fläche der Renin-negativen Felder ist durch eine dünne Linie gekennzeichnet; Maßstabsbalken: 20 µm;



### 3.2.2.9 Zusammenfassung

Im Expressionsmuster von Glattmuskelaktin, Sm22, NG2, PDGFR- $\beta$ , Kollagen I und Prokollagen I, konnten keine Unterschiede zwischen den Reninzellen von AS<sup>-/-</sup>-Mäusen und AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup>-Mäusen festgestellt werden.

Renin-arme perivaskuläre Felder in 34 Wochen alten AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigen eine verstärkte Produktion von Glattmuskelaktin und NG2 sowie eine verringerte Produktion von Kollagen I und Prokollagen I.

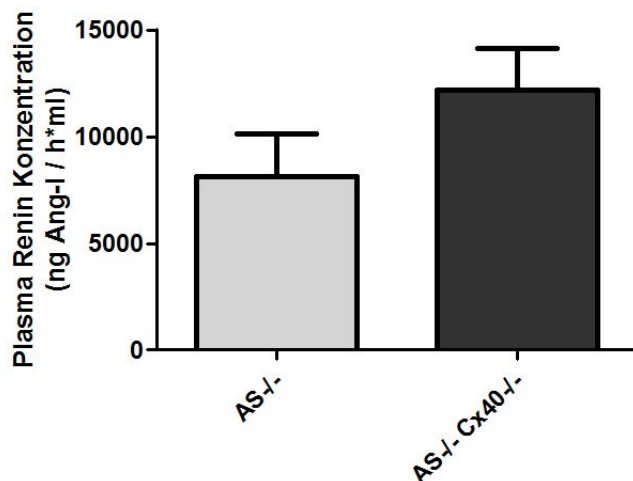
### 3.2.3 Funktionalität

Es ist bereits bekannt, dass das Fehlen von Cx40 die Regulation der Renin-Sekretion in juxtaglomerulären Zellen beeinflusst. Cx40-defiziente Mäusen zeigen trotz hohem Blutdruck erhöhte Plasma-Renin-Konzentrationen. Zudem fehlt die bekannte inverse Beziehung zwischen Perfusionsdruck und Renin-Sekretion (Wagner *et al.*, 2007). Hier sollte überprüft werden, ob Cx40 auch für die Regulation der perivaskulären Zellen in Aldosteronsynthase-defizienten Mäusen von Bedeutung ist.

#### 3.2.3.1 Plasma-Renin-Konzentration

Zur Messung der Plasma-Renin-Konzentration wurde das Blutplasma von 10-22 Wochen alten AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup>-Mäusen untersucht und mit gleichaltrigen AS<sup>-/-</sup>-Mäusen verglichen.

Wie bereits unter 3.1.3.1 beschrieben ergaben sich für die AS<sup>-/-</sup>-Tiere im Vergleich zum Wildtyp durchschnittlich 45-fach höhere Werte. Die durchschnittlich gemessene Plasma-Renin-Konzentration in AS<sup>-/-</sup>Cx40<sup>-/-</sup>-Mäusen war dagegen nochmals um das 1,5 fache erhöht (8117 ng Ang I/h\*ml in AS<sup>-/-</sup> zu 12180 ng Ang I/h\*ml in AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup>, nicht signifikant) (s. Abb. 3.39).



**Abb. 3.39: Plasma-Renin-Konzentration in AS<sup>-/-</sup>-und AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup>-Maus.** Die Daten stammen von 21 (AS<sup>-/-</sup>) bzw. 25 (AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup>) Tieren im Alter von 10-22 Wochen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM;

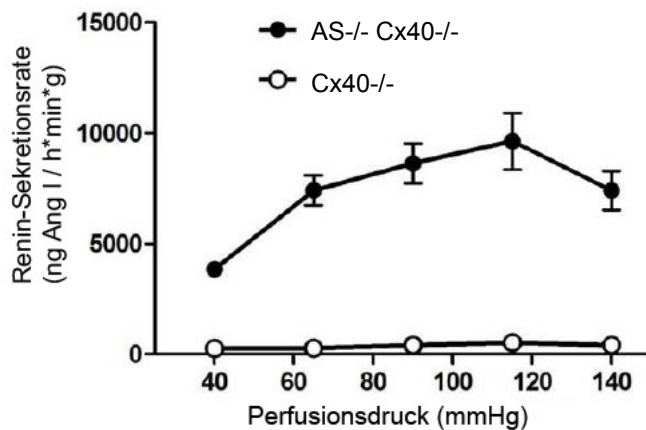
### 3.2.3.2 Regulation der Renin-Sekretion am Modell der isoliert perfundierten Niere

Am Modell der isoliert perfundierte Niere konnte die Regulation der Renin-Sekretion in AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup>-Mäusen *in vivo* untersucht werden.

#### Variation des Perfusionsdrucks

Die Renin-Sekretion erhöht sich in der isoliert perfundierten Wildtyp-Niere typischerweise mit fallendem Perfusionsdruck. Für Cx40<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten Experimente, dass das Fehlen von Cx40 zu einem Verlust dieser inversen Beziehung zwischen Perfusionsdruck und Renin-Sekretion führt (Wagner *et al.*, 2007).

Aus Abbildung 3.40 wird ersichtlich, dass auch in AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup>-Mäusen die Regulation der Reninsekretion durch den Perfusionsdruck gestört war. Die stufenweise Erhöhung des Perfusionsdrucks von 40 mmHg auf 140 mmHg führte hier zu einer tendenziell ansteigenden Renin-Sekretionsrate. Als Kontrolle gemessene Cx40<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten eine analoge Beziehung zwischen Perfusionsdruck und Renin-Sekretion.

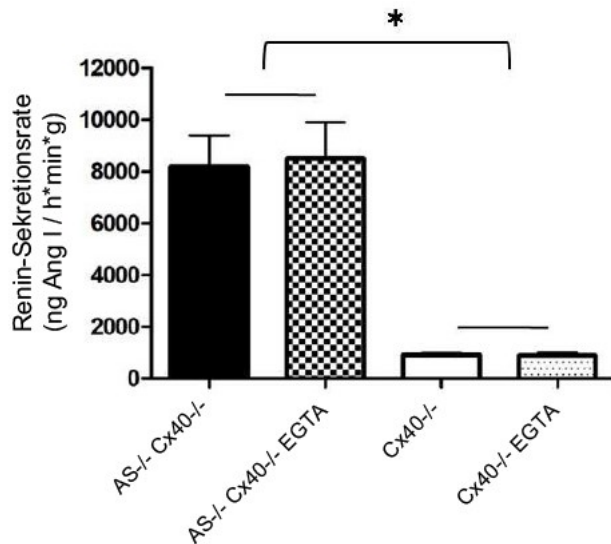


**Abb. 3.40:** Auswirkung des Perfusionsdrucks auf die Renin-Sekretion in isoliert perfundierten Nieren von Cx40<sup>-/-</sup> und AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup>-Mäusen. Zunächst wurden die isolierten Nieren in Gegenwart von 3 nmol/l Isoproterenol bei konstantem Perfusionsdruck von 90 mmHg perfundiert. Der Druck wurde dann auf 40 mmHg reduziert und anschließend schrittweise um je 25 mmHg bis auf 140 mmHg erhöht. Jede Stufe dauerte dabei 5 min. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von fünf Nieren pro Genotyp.

### Zugabe von EGTA

In der isoliert perfundierten Wildtyp-Niere führt eine Absenkung des extrazellulären Kalziums durch Zugabe von EGTA zu einem drastischen Anstieg der Renin-Sekretionsrate. In der Cx40-defizienten Niere ist dieser Effekt dagegen stark abgeschwächt (Wagner *et al.*, 2007). Durch Zugabe von 3,1 mmol/l EGTA zum Perfusat sollte in isoliert perfundierten AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup>-Nieren dieser Effekt überprüft werden. Die Renin-Sekretion war dabei durch Isoproterenol (10 nmol/l) bereits vorstimuliert.

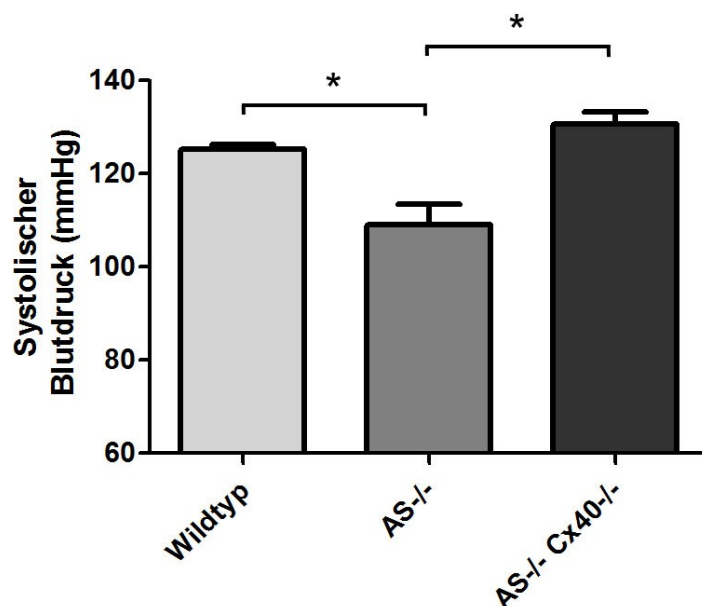
Man konnte feststellen, dass in isoliert perfundierten AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup>-Nieren die Absenkung des extrazellulären Kalziums zu keinem signifikanten Anstieg der Renin-Sekretion führte. Der gleichen Effekt war in zum Vergleich untersuchten Cx40<sup>-/-</sup>-Nieren zu beobachten (s. Abb. 3.41).



**Abb. 3.41:** Auswirkung von EGTA auf die Renin-Sekretion in isoliert perfundierten Nieren von Cx40<sup>-/-</sup>- und AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup>-Mäusen. Gezeigt ist der Effekt der Zugabe von EGTA (3,1 mmol/l) auf die Renin-Sekretionsraten (in Gegenwart von 10 nmol/l Isoproterenol) in beiden Genotypen. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von fünf Nieren pro Genotyp. (\*):  $p < 0,05$ ;

### 3.2.3.3 Blutdruck

Der Blutdruck von AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup>-Mäusen ( $130,7 \pm 2,7$  mmHg) unterschied sich nicht signifikant von Wildtyp-Mäusen ( $125,2 \pm 0,9$  mmHg) und war im Gegensatz zu AS<sup>-/-</sup>-Mäusen ( $109,1 \pm 4,2$  mmHg) signifikant erhöht (s. Abb. 3.42).



**Abb. 3.42** Systolischer Blutdruck von Wildtyp-, AS<sup>-/-</sup>- und AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup>-Mäusen. Die Daten stammen von 3 (Wildtyp) bzw. 4 (AS<sup>-/-</sup>, AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup>) Tieren im Alter von 16 Wochen; Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM; (\*):  $p < 0,05$ ;



#### 3.2.3.4 Zusammenfassung

Connexin 40 besitzt für perivaskuläre Reninzellen die gleiche funktionelle Relevanz wie für die juxtaglomerulären Zellen im Wildtyp. Im Vergleich zur AS<sup>-/-</sup>-Maus stellte man in der AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup>-Maus eine um das 1,5-fach erhöhte Renin-Sekretionsrate fest. Zudem zeigte sich, dass in AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup>-Mäusen die typische inverse Beziehung zwischen Renin-Sekretion und Perfusionsdruck aufgehoben war und dass sich die Renin-Sekretion nicht durch Absenkung des extrazellulären Kalziums stimulieren ließ. In Aldosteronsynthase-defizienten Mäusen ließ sich durch Deletion von Connexin 40 der normale Blutdruck wiederherstellen.

## 4. Diskussion

## 4.1 Lokalisation und Morphologie Renin-produzierender Zellen in der AS<sup>-/-</sup>-Maus

In Übereinstimmung mit früheren Beobachtungen von Makhanova *et al.*, (2006) fand sich in adulten AS<sup>-/-</sup>-Mäusen an allen untersuchten Glomeruli eine Hyperplasie Renin-bildender Zellen im Bereich der afferenten Arteriole (s. Abb. 3.1). Dies deutet auf eine starke Aktivierung des RAAS in diesen Mäusen hin. Deletion des Aldosteronsynthase-Gens führt dazu, dass die letzten Schritte der Bildung von Aldosteron nicht mehr enzymatisch katalysiert werden können. Lee *et al.*, (2005) konnten im Blutplasma von AS<sup>-/-</sup>-Mäusen kein Aldosteron mehr nachweisen. Die fehlende Wirkung von Aldosteron führt zu einem erniedrigten Blutdruck (s. Abb. 3.20 und Lee *et al.*, 2005; Makhanova *et al.*, 2006), der einen Stimulus für Renin-Synthese und -Sekretion darstellt. Typischerweise wird ein erhöhter Bedarf des Körpers an Renin bei einer Aktivierung des RAAS nicht durch eine erhöhte Renin-Produktion in den bestehenden Zellen gedeckt, sondern durch eine Erhöhung der Anzahl Renin-produzierender Zellen (Taugner *et al.*, 1984 a; Friis *et al.*, 2013). Während bei geringerer Stimulierung des RAAS nur glatte Muskelzellen der afferenten Arteriole zu Renin-bildenden Zellen rekrutiert werden (Cantin *et al.*, 1977; Chen *et al.*, 2007 b), führt eine stärkere Stimulierung des RAAS durch genetische Defekte innerhalb der RAAS-Kaskade dazu, dass sich neben den Zellen der afferenten Arteriole auch weitere Renin-produzierende Zellen außerhalb der Gefäßwand finden. Dies zeigte sich neben AS<sup>-/-</sup>-Mäusen beispielsweise auch in Mäusen mit Deletion der kodierenden DNA-Abschnitte für Angiotensinogen (Kim *et al.*, 1995; Niimura *et al.*, 1995; Nagata *et al.*, 1996; Kihara *et al.*, 1998), *angiotensin converting enzyme* (ACE) (Krege *et al.*, 1995; Esther *et al.*, 1996; Hilgers *et al.*, 1997), AT1a-Rezeptor (Inokuchi *et al.*, 2001) sowie AT1a- und AT1b-Rezeptor (Oliverio *et al.*, 1998; Tsuchida *et al.*, 1998). Die zusätzlichen Renin-bildenden Zellen fanden sich hier jeweils in mehreren Lagen um die afferente Arteriole angeordnet. Auch die hier untersuchten AS<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten diese für RAAS-defiziente Genotypen typische Lokalisation der Renin-bildenden Zellen außerhalb der Gefäße (s. Abb. 3.1) Eine detailliertere Betrachtung der perivaskulären Renin-positiven Zellen von AS<sup>-/-</sup>-Mäusen mittels Konfokal- und Elektronenmikroskopie (s. Abb. 3.2 und 3.3) machte deutlich, dass sich diese in ihrer Gestalt nicht von den vaskulären Reninzellen unterschieden. Sie wiesen

dieselbe kuboide Form auf und waren angefüllt mit Renin-positiven Vesikeln (Hackenthal *et al.*, 1990). Dies zeigt, dass die perivaskulären Reninzellen der AS<sup>-/-</sup>-Mäuse zu einer Verpackung von Renin in Vesikel in der Lage sind, was die Voraussetzung für eine regulierte Renin-Freisetzung darstellt. In juxtaglomerulären Zellen scheint diese, nach Aktivierung des cAMP-Signalwegs (Kurtz, 2011; Friis *et al.*, 2013), über die kontrollierte Exozytose von Renin-beinhaltenden Vesikeln abzulaufen (Peti-Peterdi *et al.*, 2004; Kurtz, 2011; Steppan *et al.*, 2013).

Um den altersabhängigen Verlauf der Reninzell-Hyperplasie in Aldosteronsynthese-defizienten Mäusen zu beobachten, wurden Nierenschnitte verschiedener Altersstadien auf ihre Renin-Expression hin analysiert (s. Abb. 3.4). Dabei wurde durch Abmessung der von den Reninzellen eingenommenen Fläche festgestellt, dass sich mit zunehmendem Alter die Anzahl Renin-positiver Zellen pro Glomerulus vergrößerte (s. Abb. 3.5). Bis zu einem Alter von etwa 16 Wochen verzehnfachte sich die Fläche Renin-positiver Zellen und blieb anschließend konstant. In den Nieren von 16-34 Wochen alten AS<sup>-/-</sup>-Tieren fanden sich im Vergleich zum Wildtyp etwa 25-mal so große Flächen an Renin-positiven Zellen pro Glomerulus. Parallel zur vergrößerten Anzahl Renin-positiver Zellen wiesen Nieren von AS<sup>-/-</sup>-Mäusen auch erhöhte Renin-mRNA-Level auf. Diese lagen bei adulten Tieren im Durchschnitt 18-fach höher als im Wildtyp (s. 3.1.1.3.2). Dies deutet darauf hin, dass in den hyperplastischen Reninzellen in ähnlicher Weise Renin produziert wird wie in den juxtaglomerulären Zellen. Machura *et al.*, (2012) konnten bereits zeigen, dass eine zunehmende Anzahl Renin-positiver Zellen in der Niere mit zunehmenden Renin-mRNA-Werten korreliert.

Allerdings fand man im Vergleich der unterschiedlichen Altersstadien konstante Renin-mRNA-Level in allen untersuchten AS<sup>-/-</sup>-Tieren und keinen Anstieg der Renin-mRNA mit zunehmendem Alter, der den Anstieg der Anzahl Renin-positiver Zellen reflektieren würde (s. Abb. 3.5 und 3.6). Dies könnte darauf hinweisen, dass die hyperplastischen Reninzellen nicht kontinuierlich Renin produzieren, sondern dass die Renin-Produktion in diesen Zellen mit zunehmendem Alter geringer wird. Durch Zunahme der Anzahl Renin-produzierender Zellen blieben die Renin-mRNA-Level dennoch konstant. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die chronische Stimulation des RAAS in AS<sup>-/-</sup>-Mäusen zu einer unkontrollierten

Vermehrung Renin-produzierender Zellen führt, auf die der Körper mit einer Regulation der Renin-Produktion in den einzelnen Zellen reagiert. Darauf weisen auch Zellen innerhalb der Renin-positiven Felder hin, in denen sich nur wenig bis gar keine Renin-Vesikel finden ließen (s. Abb. 3.2). Solche Zellen finden sich auch vermehrt in AS<sup>-/-</sup>-Mäusen, bei denen das RAAS und somit die Renin-Synthese durch Füttern einer Hochsalz-Diät unterdrückt wird (Karger *et al.*, 2013).

Bei adulten Wildtyp-Mäusen konnten über die verschiedenen Altersstadien hinweg keine Veränderungen in der Anzahl der Renin-positiven Zellen sowie den Renin-mRNA-Werten der Niere festgestellt werden. Nur eine Woche alte Tiere zeigten im Vergleich zu den adulten Tieren eine erhöhte Anzahl Renin-positiver Zellen pro Glomerulus und damit einhergehend höhere Renin-mRNA-Level (s. Abb 3.5 und 3.6). Dies ist darauf zurückzuführen, dass die verstärkte Renin-Expression, die während der Nierenentwicklung auftritt, auch eine Woche nach der Geburt noch zu erkennen ist, und sich daher noch eine vermehrte Anzahl Renin-positiver Zellen im Bereich der afferenten Arteriole findet (Sauter *et al.*, 2008; Neubauer *et al.*, 2011).

Vergleicht man die eine Woche alten Wildtyp-Nieren mit gleichaltrigen AS<sup>-/-</sup>-Nieren wird sichtbar, dass diese sich nicht deutlich in der Zahl der Renin-positiven Zellen pro Glomerulus unterscheiden. Die Renin-positiven Flächen pro Glomerulus sind in AS<sup>-/-</sup>-Tieren zu diesem Zeitpunkt nur wenig größer als im Wildtyp (s. Abb. 3.5). Dennoch zeigten sich in Nieren von einer Woche alten AS<sup>-/-</sup>-Mäusen rund fünf-mal so hohe Renin-mRNA-Level wie in Nieren von gleichaltrigen Wildtypen (s. Abb. 3.6). Dies könnte sich darauf zurückführen lassen, dass die nicht-juxtaglomerulären Renin-positiven Zellen der afferenten Arteriole in Wildtyp-Mäusen zwar während der Nephrogenese Renin produzierten (Sequeira-Lopez *et al.*, 2004; Sauter *et al.*, 2008), im Alter von einer Woche aber die Produktion von Renin und damit auch die Expression von Renin-mRNA bereits größtenteils eingestellt haben. Diese Zellen besitzen zwar noch Renin-positive Vesikel, transkribieren allerdings möglicherweise keine Renin-mRNA mehr. Während der nächsten Wochen verschwindet dann, durch Abbau oder Exozytose auch das Renin-Protein aus diesen Zellen und Renin-positive Zellen finden sich nur noch an juxtaglomerulärer Position (Sauter *et al.*, 2008). In einer Woche alten AS<sup>-/-</sup>-Mäusen scheinen dagegen alle Renin-positiven Zellen aktiv Renin zu produzieren, was sich

auch in höheren Renin-mRNA-Leveln widerspiegelt. Bei eine Woche alten Tieren ist zusätzlich zu beachten, dass die Nierenentwicklung in Mäusen noch bis etwa vier Wochen nach der Geburt andauert und hier insbesondere tubuläre Anteile sowie die Sammelrohre der Niere relativ gesehen stark an Größe zunehmen. So verdoppelt sich laut Glynn Webb (1968) in Mäusen beispielsweise das Verhältnis von Medulla- zu Nierenlänge in den ersten 17 Tagen nach der Geburt. Da sich in diesen Nierenabschnitten gewöhnlich keine Renin-produzierenden Zellen finden und die Renin-mRNA relativ zur mRNA eines Haushaltsgens (GAPDH) gemessen wird, muss man in den Nieren von jüngeren Tieren generell mit relativ höheren Renin-mRNA-Werten rechnen als in fertig entwickelten Nieren.

Bei der altersabhängigen Analyse der Renin-bildenden Zellen in AS<sup>-/-</sup>-Mäusen konnten zu allen untersuchten Zeitpunkten PCNA-positive Zellkerne innerhalb der Renin-positiven Felder gefunden werden, welche Hinweise auf mitotische Zellteilungen geben. (s. Abb. 3.7). PCNA (*p*roliferating *c*ell *n*uclear *a*ntigen) ist gemeinsam mit DNA-Polymerase  $\delta$  an der Replikation der DNA während der S-Phase des Zellzyklus beteiligt und lässt sich daher nur in proliferierenden Zellen nachweisen. Das Auftreten von PCNA in Zellkernen der Reninzellen von AS<sup>-/-</sup>-Mäusen ist daher ein Hinweis darauf, dass sich die ausgedehnten Reninzellfelder in AS<sup>-/-</sup>-Mäusen nicht nur durch Transformation bereits bestehender Zellen bilden, sondern eine Vermehrung der Renin-bildenden Zellen auch durch mitotische Zellteilungen geschehen kann. Gomez *et al.*, (2014) führen einen Zunahme der Anzahl Renin-produzierender Zellen bei stimuliertem RAAS einzig auf eine metaplastische Transformation bereits bestehender Zellen zurück, welche während der Embryonal-Entwicklung bereits Renin exprimierten. Dies können neben glatten Muskelzellen auch glomeruläre Mesangialzellen und interstitielle Perizyten sein (Sequeira-Lopez *et al.*, 2004; Gomez *et al.*, 2014). Eine Migration oder Replikation von Zellen, die zum Anstieg der Reninzell-Anzahl beitragen könnte, wird dabei ausgeschlossen (Gomez *et al.*, 2014). Die Befunde der vorliegenden Arbeit, die auf mitotische Reninzellen hindeuten, bestätigen dagegen Arbeiten von Owen *et al.*, (1994), die Ratten und Affen mit Angiotensin II-Rezeptor-Antagonisten behandelten und eine Erhöhung der Anzahl Renin-positiver Zellen fanden, die mit mitotischen Zellteilungen innerhalb der Reninzellfelder einhergingen.

## 4.2 Charakterisierung Renin-produzierender Zellen der AS<sup>-/-</sup>-Maus anhand von Zellmarker-Proteinen

Innerhalb der Niere besitzen verschiedene Zelltypen die Fähigkeit, Renin zu produzieren. Besonders gut bekannt ist die Rekrutierung glatter Gefäßmuskelzellen, die sich bei Bedarf in Renin-bildende Zellen umwandeln können (Cantin *et al.*, 1977; Gomez *et al.*, 1990; Sequeira-Lopez *et al.*, 2004). Unter bestimmten Umständen, beispielsweise bei langandauernder, starker Stimulation des RAAS werden auch andere Zelltypen, wie die Zellen des extraglomerulären Mesangiums zur Produktion von Renin angeregt (Barrter *et al.*, 1962; Dunihue und Boldosser, 1963; Barajas *et al.*, 1976; Christensen *et al.*, 1989). Über den Nachweis verschiedener Zellmarker-Proteine sollten daher Hinweise gefunden werden, ob die perivaskulären Reninzellen der AS<sup>-/-</sup>-Mäuse wie die juxtaglomerulären Zellen direkt mit den glatten Muskelzellen der afferenten Arteriole verwandt sind, oder ob diese möglicherweise von einem anderen Zelltyp abstammen. Die Ergebnisse zeigten, dass in den perivaskulären Reninzellen kaum Hinweise auf Glattmuskel-Zellmarker wie Glattmuskelaktin und Sm22 gefunden werden konnten. Auch das Reninzell-typische Protein AKR1B7 fand sich nicht in diesen Zellen. Stattdessen zeigte sich die Expression der Perizytenmarker PDGF-Rezeptor- $\beta$  und NG2. Außerdem fand sich im Bereich der perivaskulären Zellen eine starke Produktion von Kollagen I, ein verstärktes Auftreten des Vorläufer-Proteins Prokollagen I und das Gap-Junction-bildende Protein Cx40 (s. Tab. 1).

In RAAS-stimulierten Wildtyp-Mäusen war das Auftreten von Intermediärzellen, die neben Renin-Vesikeln auch Glattmuskel-spezifische Proteine aufwiesen, ein deutlicher Hinweis auf die Verwandtschaft zwischen juxtaglomerulären Zellen und glatten Muskelzellen (Cantin *et al.*, 1977; Taugner und Hackenthal, 1989; Gomez *et al.*, 1990). Innerhalb der perivaskulären Reninzellfelder von AS<sup>-/-</sup>-Mäusen findet man dagegen keine dieser Intermediärzellen. Auch Zellen der perivaskulären Felder mit offensichtlich geringerer Renin-Produktion zeigen keine verstärkte Expression der Glattmuskel-spezifischen Proteine Glattmuskelaktin und Sm22 (s. Abb. 3.2, 3.8 und 3.9). Inhibierung des RAAS durch Füttern einer Hochsalz-Diät führt übereinstimmend zwar zu einer Abnahme der Renin-Produktion in den perivaskulären Reninzellen jedoch nicht zu einer Hochregulierung Glattmuskel-



spezifischer Gene (Karger *et al.*, 2013). Innerhalb der Gefäßwand der afferenten Arteriole fanden sich jedoch auch in AS<sup>-/-</sup>-Mäusen Intermediärzellen die gleichzeitig Renin sowie Glattmuskelaktin bzw. Sm22 produzierten (s. Abb. 3.8 und 3.9).

Neben der typischen Umwandlung von glatten Muskelzellen in Renin-produzierende Zellen sind in der Niere weitere Zelltypen bekannt, die zur Produktion von Renin stimuliert werden können. Dazu gehören die Zellen des extraglomerulären Mesangiums, die sich direkt am Gefäßpol der Glomeruli finden und gemeinsam mit den juxtaglomerulären Zellen und der *Macula densa* den juxtaglomerulären Apparat bilden. Eine Stimulierung der Renin-Synthese findet sich in diesen Zellen beispielsweise im Zuge von Krankheiten die eine chronische Stimulierung des RAAS bewirken. Beispiele hierfür sind das Barrter-Syndrom (Barrter *et al.*, 1962) bzw. Pseudo-Barrter-Syndrom (Christensen *et al.*, 1989), Morbus Addison (Bohle *et al.*, 1984) sowie Krankheiten, die mit einem Volumen- und Elektrolytverlust im Körper einhergehen (Riemenschneider und Bohle, 1983). Experimentell findet sich Renin-Produktion im extraglomerulären Mesangium nach einer starken und langandauernden RAAS-Stimulierung, beispielsweise durch sechs- bis 24-monatige Mineralocorticoid-Defizienz (Dunihue und Boldosser, 1963) oder 4-wöchige unilaterale Nierenstenose (Barajas *et al.*, 1976). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten eine Übereinstimmung in der Expression ausgewählter Zellmarker zwischen den extraglomerulären Mesangialzellen der Wildtyp-Maus und den ektopischen perivaskulären Reninzellen, die in der AS<sup>-/-</sup>-Maus auftreten:

Extraglomeruläre Mesangialzellen werden genau wie die verwandten intraglomerulären Mesangialzellen als eine spezialisierte Form von Perizyten beschrieben (Kierszenbaum und Tres, 2012; Fawcett, 1998). Übereinstimmend fanden sich in Wildtyp-Mäusen im Bereich des extraglomerulären Mesangiums die Perizyten-Marker PDGF-Rezeptor-β und NG2 (s. Abb. 3.10 und 3.11). Beide Marker fanden sich auch innerhalb der perivaskulären Reninzellfelder während sich in den vaskulären Reninzellen der AS<sup>-/-</sup>-Mäuse nur NG2 eindeutig nachweisen ließ (s. Abb. 3.10 und 3.11).

Die extraglomerulären Mesangialzellen sind von einer reichhaltigen extrazellulären Matrix umgeben, weshalb man bei diesen Zellen auch von *Lacis*

(frz.: Netz, Gewebe)-Zellen spricht (Oberling und Hatt, 1960 a und b). Dies erklärt den Nachweis von Kollagen I im Feld des extraglomerulären Mesangiums von Wildtyp-Mäusen (s. Abb. 3.12). Auch die Zellen der perivaskulären Reninzellfelder der AS<sup>-/-</sup>-Mäuse waren von Kollagen I-haltiger Substanz umgeben, während sich in vaskulären Reninzellen keine Kollagen I-Produktion feststellen ließ (s. Abb. 3.12). In perivaskulären Reninzellen, nicht aber in vaskulären Reninzellen ließ sich auch Prokollagen I, die unreife Vorläuferform von Kollagen I, nachweisen. Diese Zellen waren die einzigen Zellen in der AS<sup>-/-</sup>-Niere, in denen sich Prokollagen I immunhistochemisch nachweisen ließ, was entweder auf eine besonders starke Synthese von Prokollagen I in diesen Zellen hindeutet oder auf Abweichungen in der Prozessierung dieses Vorläuferproteins (s. Abb. 3.13). In der Wildtypniere fand sich Prokollagen I dagegen einzig in wenigen Zellen im Bereich des extraglomerulären Mesangiums (s. Abb. 3.13). Dies stellt wiederum einen Hinweis darauf dar, dass sich die perivaskulären Reninzellen möglicherweise aus den ebenfalls Prokollagen I-positiven extraglomerulären Mesangialzellen entwickelt haben. Es konnten auch bereits Hinweise darauf gefunden werden, dass Renin- und Prokollagen I-Produktion in den perivaskulären Zellen in einer inversen Beziehung zueinander stehen, in dem Sinne, dass bei einer Unterdrückung des RAAS die Anzahl Renin-produzierender Zellen innerhalb der perivaskulären Zellfelder abnimmt, während gleichzeitig eine Zunahme Prokollagen I-produzierender Zellen zu beobachten ist (Karger *et al.*, 2013). Im Wildtyp dagegen scheint bei einer Stimulation des RAAS eine Abnahme der Prokollagen I-Produktion im extraglomerulären Mesangium mit einem gleichzeitigen Anstieg der Renin-Synthese in diesen Zellen einherzugehen (Karger *et al.*, 2013).

In Übereinstimmung mit früheren Befunden (Kurtz *et al.*, 2009 b; Hanner *et al.*, 2010; Bosco *et al.*, 2011) konnte festgestellt werden, dass die extraglomerulären Mesangialzellen der Wildtyp-Mäuse das Gap-Junction-bildende Protein Connexin 40 (Cx40) exprimieren und über dieses mit den benachbarten juxtaglomerulären Zellen und intraglomerulären Mesangialzellen in Kontakt stehen (s. Abb. 3.14). Cx40 fand sich auch stark ausgeprägt in den perivaskulären Reninzellen der AS<sup>-/-</sup>-Mäuse (s. Abb. 3.14). Hier bestätigt sich die Annahme, dass die Expression von Cx40 ein grundlegendes Merkmal aller Renin-produzierenden Zellen ist (Castrop *et al.*, 2010; Kurtz *et al.*, 2009 b). Cx40 findet sich sowohl in den fötalen Reninzellen

der größeren renalen Gefäße wie auch in den juxtaglomerulären Zellen (Kurtz *et al.*, 2009 b). Stimulation der Renin-Synthese in glatten Muskelzellen der afferenten Arteriole bewirkt, dass in diesen Zellen neben der Produktion von Renin auch die Synthese von Cx40 erfolgt (Kurtz *et al.*, 2009 b). Das Auftreten von Cx40 in den perivaskulären Zellen der AS<sup>-/-</sup>-Mäuse bekräftigt die Idee, dass die Renin-Synthese über ein gemeinsames genetisches Programm mit der Synthese von Cx40 in Verbindung steht (Kurtz *et al.*, 2009 b). Cx40 scheint in den Reninzellen für die Koordination der Renin-Freisetzung von Bedeutung (Wagner *et al.*, 2007; Wagner und Kurtz, 2013), so dass das Vorkommen von Cx40 in den perivaskulären Reninzellen möglicherweise die Voraussetzung für eine regulierte Renin-Freisetzung aus diesen Zellen darstellt.

Brunskill *et al.* (2011) konnten mit Hilfe von Genexpressionsanalysen isolierter Reninzellen zeigen, dass diese im Vergleich mit anderen Nierenzellen verstärkt Aldoketoreduktase 1B7 (AKR1B7) exprimieren. Auch immunhistochemisch ließ sich AKR1B7 hauptsächlich in Reninzellen bzw. Intermediärzellen der afferenten Arteriole nachweisen. Auch glatte Muskelzellen, die sich nach Stimulation des RAAS in Renin-produzierende Zellen umgewandelt hatten, zeigten sich in Folge der Umwandlung AKR1B7-positiv (Machura *et al.*, 2012). Gomez *et al.* (2014) beschreiben die Expression von AKR1B7 daher als charakteristisch für den endokrinen Reninzell-Phänotyp und als einen unabhängigen Marker der Renin-produzierenden Zellen. Die Expression von AKR1B7 im Wildtyp konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. In den perivaskulären Reninzellen von AS<sup>-/-</sup>-Mäusen ließ sich AKR1B7 allerdings nicht eindeutig nachweisen (s. Abb. 3.15). Dies stimmt mit den Befunden von Machura *et al.* (2012) überein, die in ektopischen Reninzellen von AS<sup>-/-</sup>- bzw. Cx40<sup>-/-</sup>-Mäusen wenig bis gar kein AKR1B7-Signal fanden. Dies wiederum verstärkt die Annahme, dass die perivaskulären Reninzellen möglicherweise nicht von den vaskulären Reninzellen abstammen.

Wie der Nachweis verschiedener Zellmarker-Proteine zeigte, scheinen sich die perivaskulären Reninzellen von AS<sup>-/-</sup>-Mäusen in der Produktion verschiedener Proteine von den typischen vaskulären Reninzellen zu unterscheiden (Glattmuskelaktin, Sm22, PDGF-Rezeptor-β, Kollagen I, Prokollagen I, AKR1B7). Stattdessen gleichen sie im Expressionsmuster aller untersuchten Proteine den Zellen des extraglomerulären Mesangiums. Dies ist ein Hinweis darauf, dass es sich

bei den perivaskulären Reninzellen möglicherweise auch um umgewandelte extraglomeruläre Mesangialzellen handeln könnte. Renin-produzierende extraglomeruläre Mesangialzellen wurden auch schon beim Menschen in Patienten mit Aldosteron-Mangel-Erscheinungen beschrieben (Bohle *et al.*, 1984). Die starke Plastizität extraglomerulärer Mesangialzellen zeigt sich nicht nur bei der Transformation in Renin-produzierende Zellen. So wurde auch bereits gezeigt, dass extraglomeruläre Mesangialzellen in der Lage sind, in den Glomerulus zu migrieren um hier bei Bedarf Podozyten oder intraglomeruläre Mesangialzellen zu ersetzen (Pippin *et al.*, 2013 und 2014; Hugo *et al.*, 1997).

### 4.3 Funktionalität perivaskulärer Reninzellen in AS<sup>-/-</sup>-Mäusen

Wie beschrieben fanden sich in dieser Arbeit Unterschiede im Genexpressionsmuster zwischen typischen vaskulären und perivaskulären Reninzellen. Möglicherweise weist dies darauf hin, dass sich diese beiden Reninzelltypen auch in ihrer Funktionalität unterscheiden. So ließ sich beispielsweise in perivaskulären Reninzellen im Gegensatz zu vaskulären keine immunhistochemisch nachweisbare Aldoketoreduktase 1B7 finden. Dieses Enzym ist an der Reduktion von schädlichen Aldehyden und Ketonen, welche in Hormonsynthetisierenden Zellen entstehen, beteiligt und kann so zu einer Entgiftung der Zellen beitragen (Brunskill *et al.*, 2011; Gomez *et al.*, 2014). Der Umstand, dass sich dieses Enzym in perivaskulären Reninzellen nicht finden ließ, könnte auf eine veränderte Funktion dieser Renin-produzierenden Zellen hindeuten, die durch andere Stoffwechselvorgänge in der Zelle gekennzeichnet ist. Die gesteigerte Produktion von Prokollagen I bzw. Kollagen I im Bereich der perivaskulären Reninzellen könnte zu vermehrter interzellulärer Substanz beitragen, die die Signalübertragung zu den Zellen bzw. die Kommunikation zwischen einzelnen Zellen und damit eine Koordination der Renin-Freisetzung stören könnte. Zudem ist zu bedenken, dass weitere Unterschiede im Genexpressions-Muster zwischen vaskulären und perivaskulären Zellen vorhanden sein können, die in dieser Arbeit nicht beachtet wurden. Neben einer unterschiedlichen Ausstattung mit Proteinen könnte auch die ektopische Position der perivaskulären Reninzellen dazu

beitragen, dass die Regulation der Renin-Sekretion in diesen Zellen nicht in gleicher Weise abläuft wie in den vaskulären Reninzellen. So besitzen die perivaskulären Reninzellen beispielsweise keinen direkten Kontakt zu den, an der Renin-Regulation beteiligten, Endothelzellen der afferenten Arteriole (Kurtz *et al.*, 1991; Romero *et al.*, 1992). Zudem ist unklar, wie bzw. ob, per Exozytose aus diesen ektopischen Reninzellen freigesetztes, Renin überhaupt in der Lage ist, die Blutbahn zu erreichen.

Es konnte festgestellt werden, dass die Plasma-Renin-Konzentration in AS<sup>-/-</sup>-Mäusen durchschnittlich 45-mal höher lag als in den zum Vergleich vermessenen Wildtyp-Mäusen (s. Abb. 3.16). Diese Werte ähneln denen von Lee *et al.* (2005) und Makhanova *et al.* (2006), die für Aldosteronsynthese-defiziente Mäuse 45- bzw. 40-fach erhöhte Plasma-Renin-Konzentrationen beschreiben. Die starke Erhöhung der Plasma-Renin-Konzentration in Aldosteronsynthese-defizienten Mäusen lässt darauf schliessen, dass neben den vaskulären Reninzellen auch die perivaskulären Reninzellen zur Freisetzung von Renin in der Lage sind und so zur erhöhten Konzentration von enzymatisch aktivem Renin im Blutkreislauf beitragen. Rasch *et al.* (1998) konnten durch stereologische Untersuchungen von RAAS-stimulierten Ratten bereits zeigen, dass rekrutierte Reninzellen der afferenten Arteriole in gleichem Maße wie juxtaglomeruläre Reninzellen zu einer Erhöhung der Plasma-Renin-Konzentration beitragen. Ein Anstieg des Volumens Renin-positiver Zellen um den Faktor 17 im Vergleich zu Wildtypen, war hier mit einer 36-fach höheren Plasma-Renin-Konzentration verbunden (Rasch *et al.*, 1998). In Übereinstimmung mit diesen und ähnlichen (Nakamura *et al.*, 1985) Befunden geht in der vorliegenden Arbeit eine 45-fache Erhöhung der Plasma-Renin-Konzentration mit einer 25-fach größeren Fläche Renin-positiver Zellen in Nierenschnitten von AS<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp einher (s. Abb. 3.5 und 3.16). Diese unverhältnismäßigen Werte würden darauf hindeuten, dass die Stimulation der Renin-Sekretion hier nicht nur durch eine Erhöhung der Anzahl Renin-produzierender Zellen geschieht, sondern auch durch eine verstärkte Renin-Sekretion aus den einzelnen Zellen. Eine 18-fache Erhöhung der renalen Renin-mRNA weist daraufhin, dass in den Reninzellen der AS<sup>-/-</sup>-Mäuse keine verstärkte Produktion von Renin stattfindet und die Erhöhung des Plasma-Renin-Spiegels allein durch eine verstärkte Freisetzung des gespeicherten Renins erfolgt (s. Abb.

3.6). Taugner *et al.* (1984 a) zeigten bereits, dass Renin-produzierende Zellen deutlich mehr gespeichertes Renin beinhalten als unter physiologischen Bedingungen benötigt wird. Als weitere Möglichkeit für die Erklärung der erhöhten Plasma-Renin-Konzentration könnte jedoch auch eine verlängerte Halbwertszeit von Renin im Blutkreislauf der AS<sup>-/-</sup>-Mäuse in Betracht gezogen werden (Johnson *et al.*, 1971).

Die erhöhte Anzahl Renin-produzierender Zellen sowie die erhöhten Werte für renale Renin-mRNA und Plasma-Renin-Konzentration sind Ausdruck eines stark stimulierten RAAS in Aldosteronsynthase-defizienten Mäusen. Einen Auslöser für die Stimulation des RAAS könnte der erniedrigte Blutdruck in AS<sup>-/-</sup>-Mäusen darstellen. Dieser lag mit  $109,1 \pm 4,2$  mmHg um  $16,1 \pm 5,1$  mmHg unterhalb der Werte von vergleichbaren Wildtyp-Mäusen ( $125,2 \pm 0,9$  mmHg) (s. Abb. 3.20). Diese Ergebnisse bestätigen frühere Versuche mit AS<sup>-/-</sup>-Mäusen, bei denen ein um 15 mmHg erniedrigter Blutdruck festgestellt wurde (Makhanova *et al.*, 2006). Das Fehlen von Aldosteron in Aldosteronsynthase-defizienten Mäusen (Lee *et al.*, 2005) führt zu einer verminderten Natrium- und Wasser-Rückresorption im distalen Nephron, was zu einer Abnahme des extrazellulären Volumens und damit zu einem Abfall des Blutdrucks führen kann. Makhanova *et al.* (2006) konnten allerdings zeigen, dass neben dem Blutdruck auch Störungen des Elektrolytgleichgewichts im Lumen des distalen Tubulus, welche über die *Macula densa*-Zellen registriert werden, in AS<sup>-/-</sup>-Mäusen maßgeblich an der Stimulation des RAAS beteiligt sind.

Das Auftreten hyperplastischer Reninzellen in AS<sup>-/-</sup>-Mäusen ist die Folge eines chronisch stimulierten RAAS. Wie bereits gut bekannt ist, lässt sich die Renin-Sekretion jedoch auch, sowohl in juxtaglomerulären Zellen wie auch in rekrutierten Zellen der afferenten Arteriole, durch eine Vielzahl von Faktoren akut stimulieren bzw. inhibieren (Schweda *et al.*, 2007; Kurtz, 2011). Der Körper kann so durch eine vermehrte bzw. verminderte Sekretion von Renin aus vorhandenen Speichervesikeln kurzfristig auf einen veränderten Bedarf an Renin reagieren. Durch Analyse der Renin-Freisetzung in der isoliert perfundierten Niere wurde hier untersucht, ob sich die Renin-Sekretion in den hyperplastischen perivaskulären Reninzellen der AS<sup>-/-</sup>-Niere in ähnlicher Weise wie in den juxtaglomerulären Zellen des Wildtyps akut regulieren lässt.

In juxtaglomerulären Zellen stellt ein Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration einen der entscheidenden Faktoren für eine vermehrte Renin-Freisetzung dar (Schweda *et al.*, 2007; Kurtz, 2011). Demzufolge konnte in der isoliert perfundierten Wildtyp-Niere die Renin-Sekretion durch Zugabe des Sympathomimetikums Isoproterenol dosisabhängig gesteigert werden (s. Abb. 3.17 A). Isoproterenol ist in der Lage, an  $\beta_1$ -adrenerge Rezeptoren der juxtaglomerulären Zellen zu binden und aktiviert auf diese Weise den intrazellulären cAMP-Signalweg (Holmer *et al.*, 1997; Kurtz, 1997; Schweda und Kurtz, 2004). Der Vergleich mit Nieren von  $AS^{-/-}$ -Mäusen machte deutlich, dass in diesen die Renin-Sekretion, ausgehend von erhöhten Basalwerten, in Reaktion auf Zugabe von Isoproterenol relativ gesehen in gleicher Weise gesteigert wurde (s. Abb. 3.17 A). Dies deutet darauf hin, dass auch in den perivaskulären Reninzellen der  $AS^{-/-}$ -Mäuse eine Erhöhung des cAMP Spiegels zu einer kurzfristigen Steigerung der Renin-Sekretionsrate führt. Dies könnte entweder bedeuten, dass auch diese Zellen, genau wie die juxtaglomerulären Zellen,  $\beta_1$ -adrenerge Rezeptoren aufweisen oder dass ein Signal zur vermehrten Renin-Freisetzung von juxtaglomerulären Zellen auf perivaskuläre Zellen, beispielsweise über Gap-Junctions, übertragen wird.

Während die Aktivierung des cAMP-Signalwegs stimulierend auf die Renin-Freisetzung wirkt, wird einer Erhöhung der intrazellulären freien Kalzium-Konzentration ein hemmender Einfluss auf die Renin-Sekretionsrate zugesprochen (Beierwaltes, 2010; Kurtz, 2011; Atchison und Beierwaltes, 2013). Entsprechend zeigte sich, dass die Zugabe von EGTA zum Perfusat und damit die Absenkung der extrazellulären Kalzium-Konzentration, in der Wildtyp-Niere mit einer verstärkten Renin-Sekretion verbunden war. Dass auch in der isoliert perfundierten  $AS^{-/-}$ -Niere die Renin-Sekretionsrate im selben Versuch gesteigert werden konnte, weist darauf hin, dass auch in den perivaskulären Zellen die Renin-Sekretion einer Kalzium-vermittelten Kontrolle unterliegt (s. Abb. 3.17 B).

Dies wird auch durch die Inhibierung der Renin-Sekretion durch Angiotensin II deutlich. Diese konnte sowohl in Wildtyp- wie auch in  $AS^{-/-}$ -Nieren beobachtet werden (s. Abb. 3.18 A). Angiotensin II bindet an AT1-Rezeptoren Renin-produzierender Zellen und vermittelt über eine gesteigerte Aktivität der Phospholipase C einen Anstieg der intrazellulären Kalzium-Konzentration und



damit eine Hemmung der Renin-Sekretion (Kurtz und Penner, 1989; Kurtz und Wagner, 1999; Höcherl *et al.*, 2001). Dass durch Zugabe von Angiotensin II auch in der AS<sup>-/-</sup>-Niere die Renin-Sekretionsrate gesenkt werden konnte, lässt vermuten, dass auch die perivaskulären Reninzellen mit AT1-Rezeptoren ausgestattet sind. Der vasokonstriktorische Effekt, den Angiotensin II über Bindung an Rezeptoren glatter Muskelzellen ausübt, wurde in der isoliert perfundierten Niere durch eine Absenkung des Perfusat-Flusses in beiden Genotypen deutlich (s. Abb. 3.18 B).

Einen wichtigen Stimulus für eine akute Stimulierung der Renin-Sekretion stellt der Abfall des renalen Blutdrucks dar. Über einen bisher unbekannten Barorezeptor-Mechanismus wird dieser innerhalb der Niere registriert und führt zu einer verstärkten Freisetzung von Renin. Ein Anstieg des Blutdrucks hemmt dagegen die Renin-Sekretion (Schweda *et al.*, 2007; Kurtz, 2011) Übereinstimmend zeigte sich am Modell der isoliert perfundierten Niere mit zunehmendem Perfusionsdruck eine Abnahme der Renin-Sekretionsrate (s. Abb. 3.19 A). Dieser Effekt konnte sowohl in der Wildtyp- wie auch in der AS<sup>-/-</sup>-Niere beobachtet werden, was zeigt, dass auch in den perivaskulären Reninzellen die Kontrolle der Renin-Sekretion dem Barorezeptor-Mechanismus unterliegt, der für die inverse Beziehung zwischen Blutdruck und Renin-Sekretion verantwortlich ist.

Zusammenfassend deuten die erhaltenen Befunde darauf hin, dass die Renin-Sekretion in perivaskulären Reninzellen durch dieselben Mechanismen kontrolliert wird, die bereits für juxtaglomeruläre Reninzellen beschrieben wurden (Schweda *et al.*, 2007; Kurtz, 2011; Friis *et al.*, 2013).

#### 4.4 Relevanz von Cx40 für perivaskuläre Renin-bildende Zellen

Im Zuge der immunhistochemischen Analyse der perivaskulären Reninzellen von AS<sup>-/-</sup>-Mäusen konnte gezeigt werden, dass diese, genau wie die juxtaglomerulären Reninzellen der Wildtypmäuse, das Gap-Junction-bildende Protein Connexin 40 exprimieren (s. Abb. 3.14). In Wildtypmäusen konnte bereits festgestellt werden, dass Connexin 40 von großer Bedeutung für die Renin-produzierenden Zellen ist. Zum einen führt der Verlust von Connexin 40 zu einer Dislokation der Renin-produzierenden Zellen. Während sie sich normalerweise innerhalb der Gefäßwand

der afferenten Arteriole finden, verlagern sie sich in Cx40<sup>-/-</sup>-Mäusen in den Bereich des extraglomerulären Mesangiums und des periglomerulären Interstitiums (Kurtz *et al.*, 2007). Zum anderen ist Cx40 wichtiger Bestandteil der negativen Rückkopplungs-Kontrolle der Renin-Sekretion durch den renalen Perfusionsdruck. Verlust von Cx40 führt trotz erhöhtem Blutdruck zu einer verstärkten Renin-Freisetzung *in vivo* (Krattinger *et al.*, 2007; Wagner *et al.*, 2007). In dieser Arbeit wurde anhand von AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup>-Mäusen der Einfluss von Connexin 40 auf die Funktion der perivaskulärer Reninzellen untersucht.

Das Fehlen von Cx40 hatte scheinbar keinen Einfluss auf die Struktur und die Anzahl der Renin-produzierenden Zellen (s. Abb. 3.22 und 3.23). Wie in AS<sup>-/-</sup>-Mäusen war ein Anstieg der Reninzell-Zahl mit zunehmendem Alter zu beobachten. Die Größe der von den Renin-positiven Zellen pro Glomerulus eingenommenen Fläche entsprach den Werten, die auch für AS<sup>-/-</sup>-Mäuse gemessen wurden (s. Abb. 3.24 und 3.25). Bei der genaueren Betrachtung der Reninzell-Felder wurde deutlich, dass sich die Renin-produzierenden Zellen in AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup>-Mäusen nicht ausschließlich außerhalb der Gefäße fanden, wie dies aus Cx40<sup>-/-</sup>-Mäusen bekannt ist (Kurtz *et al.*, 2007). Während in Cx40<sup>-/-</sup>-Mäusen die *Media* der afferenten Arteriole auch im juxtaglomerulären Bereich ausschließlich von glatten Muskelzellen gebildet wird, finden sich in AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup>-Mäusen auch Renin-produzierende Zellen innerhalb der Gefäßwand (s. Abb. 3.22 und 3.23). Dies zeigt, dass bei starker Stimulation des RAAS auch in Connexin 40-defizienten Mäusen die glatten Muskelzellen der afferenten Arteriole zur Produktion von Renin angeregt werden können. Kurtz *et al.* (2007) beobachteten bei einer Stimulation des RAAS durch Nidrigsalz-Diät in Verbindung mit der Gabe eines ACE-Inhibitors in Cx40<sup>-/-</sup>-Mäusen nur eine Zunahme von Renin-produzierenden Zellen außerhalb der Gefäße. Die glatten Muskelzellen konnten hier nicht zur Renin-Bildung rekrutiert werden.

Bis zu einem Alter von 10 Wochen waren keine offensichtlichen Unterschiede in der Verteilung der Reninzellen zwischen AS<sup>-/-</sup>- und AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup>-Mäusen zu erkennen, wohingegen bei älteren Tieren mit zunehmender Reninzell-Anzahl auch Unterschiede in der Lokalisation der perivaskulären Reninzellen deutlich wurden. Während in AS<sup>-/-</sup>-Nieren die perivaskulären Reninzellen auf einen klar abgegrenzten Bereich um die afferente Arteriole beschränkt blieben, führte der

Verlust von Connexin 40 mit zunehmendem Alter bzw. zunehmender Reninzell-Zahl offensichtlich zu einer Verlagerung der perivaskulären Reninzellen (s. Abb. 3.26 und 3.27). Die Zellen waren nicht mehr, wie in AS<sup>-/-</sup>-Mäusen auf einen festen Zellverband um die afferente Arteriole beschränkt, sondern fanden sich vermehrt im Interstitium zwischen den angrenzenden Tubuli und umschlossen teilweise die Bowman-Kapsel des Glomerulus.

Der immunhistochemische Nachweis der bereits beschriebenen Zellmarker-Proteine lieferte keine Unterschiede zwischen den hyperplastischen Reninzellen von AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup>-Mäusen und AS<sup>-/-</sup>-Mäusen, was vermuten lässt, dass diese ektopischen Reninzellen in beiden Genotypen denselben Ursprung besitzen (s. Abb. 3.31- 3.37). Wie beschrieben zeigten sich Hinweise auf eine Verwandtschaft mit den extraglomerulären Mesangialzellen. Dies ist in Übereinstimmung mit der Arbeit von Kurtz *et al.* (2007) die Renin-positive Zellen in Cx40<sup>-/-</sup>-Mäusen im Bereich des extraglomerulären Mesangiums beschreiben. Die Renin-positiven Zellen, die in älteren AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup>-Mäusen im Bereich der Bowman-Kapsel gefunden wurden, deuteten auf eine zusätzliche Transformation von parietalen Epithelzellen zu Renin-produzierenden Zellen hin (s. Abb. 3.27). Erst kürzlich wurden Hinweise gefunden, dass sich Zellen der Reninzelllinie bei Bedarf in parietale Epithelzellen umwandeln können (Pippin *et al.*, 2013). Jedoch zeigte eine detailliertere Betrachtung der Zellen keine Ko-Expression mit Claudin 1 (s. Abb. 3.27), welches typischerweise in parietalen Epithelzellen zu finden ist (Pippin *et al.*, 2013). Dies lässt vermuten, dass es sich bei diesen Renin-positiven Zellen eher um interstitielle Zellen handelt, die der Bowman-Kapsel aufliegen und die zur Produktion von Renin stimuliert werden können. Sequeira-Lopez *et al.* (2004) fanden bereits Hinweise, dass sich im Bereich der Bowman-Kapsel Zellen der Reninzelllinie befinden, die sich bei Bedarf in Renin-produzierende Zellen umwandeln können.

Interessanterweise zeigte sich in den Nieren von 34 Wochen alten AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup>-Mäusen an einer Vielzahl von Glomeruli ein offensichtlicher Rückgang der Renin-Produktion, der auch mit erniedrigten Renin-mRNA-Werten in der Niere verbunden war (s. Abb. 3.28, 3.29 und 3.30). Während ein Teil der Glomeruli weiterhin ausgedehnte Reninzellfelder aufwies, fand sich an anderen Glomeruli zwar auch eine Vielzahl perivaskulärer Zellen, diese zeigten jedoch nur noch eine

geringe Menge bis gar kein immunhistochemisch nachweisbares Renin (s. Abb. 3.28 und 3.29). Neben Renin ließ sich auch Kollagen I bzw. Prokollagen I nur noch in geringerem Ausmaß nachweisen (s. Abb. 3.38). Stattdessen fand sich in diesen Zellen verstärkt Glattmuskelaktin und NG2, was darauf hindeutet, dass in diesen Zellen mit der Abnahme der Renin-Produktion auch eine weitreichendere Dedifferenzierung verbunden ist (s. Abb. 3.38). Das verstärkte Auftreten von Glattmuskelaktin und NG2 könnte auf eine Transformation in glatte Muskelzellen hindeuten, jedoch zeigten diese Zellen keine Expression weiterer Glattmuskel-spezifischer Proteine wie Sm22 und Calponin (s. Abb. 3.38). Man könnte daher eine Umwandlung in Myofibroblasten-ähnliche Zellen vermuten: Lin *et al.* (2008) und Humphreys *et al.* (2010) beschrieben bereits die Transformation von Reninzell-verwandten Perizyten zu Myofibroblasten. Auch aus Nieren isolierte Reninzellen verlieren ihre Fähigkeit Renin zu produzieren und dedifferenzieren zu Fibroblasten-ähnlichen Zellen. Es ist denkbar, dass bei den isolierten Reninzellen, genau wie bei den Reninzellen der AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup>-Maus, eine fehlende Kopplung über Gap-Junctions für die Dedifferenzierung der Zellen verantwortlich ist.

Im Vergleich zu AS<sup>-/-</sup>-Mäusen wiesen AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup>-Mäuse bei gleicher Reninzell-Anzahl und gleichen Renin-mRNA-Werten tendenziell höhere Plasma-Renin-Konzentrationen auf (s. Abb. 3.25, 3.30 und 3.39), was Versuche mit Cx40<sup>-/-</sup>-Mäusen bestätigt, die ebenso darauf hindeuten, dass die Freisetzung von Renin aus den Renin-produzierenden Zellen in Abwesenheit von Connexin 40 erhöht ist (Krattinger *et al.*, 2007; Wagner *et al.*, 2007). Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass Connexin 40 für die Weiterleitung inhibitorischer Signale verantwortlich ist, die die Renin-Synthese und -Sekretion beeinflussen. So wurde bereits vermutet, dass Connexin 40 an der Übertragung eines inhibitorischen Kalzium-Signals beteiligt ist, über welches die *Macula densa*-Zellen auf die Renin-produzierenden Zellen Einfluss nehmen (Kurtz *et al.*, 2007; Toma *et al.*, 2008). Dass die erhöhte Plasma-Renin-Konzentration, die man in Cx40<sup>-/-</sup>-Mäusen findet, in Verbindung mit einem erhöhten Blutdruck gemessen wurde (Krattinger *et al.*, 2007; Kurtz *et al.*, 2007), bestätigt wiederum die Theorie einer fehlenden Kontrolle der Renin-Sekretion in Abwesenheit von Connexin 40. Im Wildtyp wird die Freisetzung von Renin durch den Blutdruck im Sinne einer negativen Rückkopplung kontrolliert, so dass ein hoher Blutdruck zu einer Inhibition der

Renin-Sekretion führt. In Abwesenheit von Connexin 40 scheint diese inverse Beziehung zwischen Blutdruck und Renin-Sekretion jedoch aufgehoben, wie Versuche an isoliert perfundierten Nieren von Cx40<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigten (Krattinger *et al.*, 2007; Kurtz *et al.*, 2007). Man konnte vermuten, dass in Cx40<sup>-/-</sup>-Mäusen die anormale Position der Renin-produzierenden Zellen, die nicht mehr in der *Media* der afferenten Arteriole zu finden waren, dazu führte, dass Unterschiede im Blutdruck nicht mehr registriert wurden (Schweda *et al.*, 2007). Jedoch zeigte sich auch bei den hier untersuchten AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup>-Mäusen die fehlende Kontrolle der Renin-Sekretion durch den Blutdruck (s. Abb. 3.40). Da sich in AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup>-Mäusen Renin-produzierende Zellen auch innerhalb der Gefäßwand der afferenten Arteriole finden (s. Abb. 3.22), scheint nicht die Position der Renin-produzierenden Zellen sondern das Fehlen der Cx40-Gap-Junctions an sich für die fehlerhafte Kontrolle der Renin-Sekretion verantwortlich. Dies unterstützt Experimente, die zeigten, dass im Wildtyp nach Gabe von unspezifischen Gap-Junction-Blockern die Regulation der Renin-Sekretion durch den Perfusionsdruck nicht aufrechterhalten werden konnte (Wagner *et al.*, 2007). Man kann vermuten, dass das Fehlen der Gap-Junctions dazu führt, dass innerhalb des Verbandes der Renin-produzierenden Zellen die Weiterleitung eines Kalzium-Signals verhindert wird. Dies lässt sich daraus folgern, dass auch im Wildtyp nach Absenkung der extrazellulären Kalzium-Konzentration ein Verlust der Renin-Sekretions-Kontrolle durch den Perfusionsdruck zu beobachten ist (Schweda *et al.*, 2000; Lai *et al.*, 2011). Im Normalfall bewirkt ein steigender Perfusionsdruck einen verstärkten transmembranen Kalziumeinstrom in die Renin-produzierenden Zellen, der inhibierend auf die Renin-Sekretion wirkt (Kurtz und Penner, 1989; Yao *et al.*, 2003). Unabhängig vom Perfusionsdruck konnte hier sowohl in der Wildtyp-Maus als auch in der AS<sup>-/-</sup>-Maus gezeigt werden, dass eine Absenkung des extrazellulären Kalziums zu einer Stimulation der Renin-Sekretion führt (s. Abb. 3.17 B). Das Fehlen von Connexin 40 bewirkte dagegen in Cx40<sup>-/-</sup>- wie auch in AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup>-Mäusen, dass im gleichen Versuch keine Steigerung der Renin-Sekretion festgestellt werden konnte (s. Abb. 3.41). Dies bestätigt, dass in Abwesenheit von Connexin 40 der Kalzium-Signalweg gestört ist.

Wie beschrieben, führt möglicherweise die fehlende Kontrolle der Renin-Synthese und -Sekretion durch den Blutdruck in Cx40<sup>-/-</sup>-Mäusen zu der ungewöhnlichen

Kombination eines erhöhten Blutdrucks in Verbindung mit einer erhöhten Plasma-Renin-Konzentration. Interessanterweise lässt sich der Blutdruck dabei durch Gabe von Inhibitoren des RAAS, wie Angiotensin II-AT1-Rezeptor-Blockern oder ACE-Inhibitoren, korrigieren, was darauf hindeutet, dass die hohen Renin-Werte Ursache des Bluthochdrucks sind. Diese Idee bestätigt sich auch dadurch, dass das Fehlen von Aldosteron, das ein Effektor-Hormon des RAAS darstellt, in  $AS^{-/-} Cx40^{-/-}$ -Mäusen zu einer Wiederherstellung des normalen Blutdrucks führt (s. Abb. 3.42).

Zusammenfassend deutet die Untersuchung der  $AS^{-/-} Cx40^{-/-}$ -Tiere darauf hin, dass Connexin 40 für hyperplastische Reninzellen die gleiche funktionelle Relevanz besitzt wie für juxtaglomeruläre Zellen. So beeinflusste die Abwesenheit von Connexin 40 in Aldosteronsynthese-defizienten Mäusen die Lokalisation der Reninzellen und führte hier zu einer fehlerhaften Kontrolle der Renin-Sekretion.

## 5. Zusammenfassung



Die Zahl der Renin-bildenden Zellen in der Niere wird durch die Aktivität des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systemes (RAAS) im Sinne einer negativen Rückwirkungskontrolle reguliert. In der Niere des Erwachsenen induziert eine pharmakologische Hemmung des RAAS eine Hypertrophie der typischen juxtaglomerulären Renin-bildenden Zellen und zusätzlich eine metaplastische Transformation von glatten Muskelzellen der afferenten Arteriolen in Renin-bildende Zellen. Genetische Defekte des RAAS induzieren zusätzlich eine starke Hyperplasie perivaskulärer Renin-bildender Zellen.

Ziel dieser Arbeit war, Struktur und Funktion solcher perivaskulären, hyperplastischen Reninzellen zu charakterisieren und mit den normalen juxtaglomerulären Renin-bildenden Zellen bzw. transformierten glatten Muskelzellen (vaskuläre Reninzellen) zu vergleichen.

Als Tiermodell mit einem genetischen Defekt des RAAS wurden Mäuse mit einer Deletion des Aldosteronsynthase-Gens verwendet ( $AS^{-/-}$ ).

Die Untersuchung verschiedener Altersstadien zeigte zunächst, dass im Altersbereich zwischen 1 und 16 Wochen die Zahl der (peri)vaskulären Reninzellen pro Glomerulus etwa um den Faktor 10 zunahm und anschließend konstant blieb.

Die immunhistochemische Analyse erbrachte deutliche Unterschiede zwischen vaskulären und perivaskulären Reninzellen. Während vaskuläre, nicht aber perivaskuläre Reninzellen Glattmuskelaktin, Sm22 und Aldoketoreduktase 1B7 exprimierten, fand sich in den perivaskulären, nicht aber in den vaskulären Reninzellen Expression von Kollagen I und PDGF-Rezeptor- $\beta$ . In beiden Reninzelotypen wurde Connexin 40 und das Proteoglycan NG2 exprimiert. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die perivaskulären Reninzellen nicht von den glatten Muskelzellen der Gefäße abstammen, sondern vielmehr mit den Pericyten-ähnlichen Zellen des extraglomerulären Mesangiums verwandt sind. Hier fand sich im Wildtyp die Expression von Kollagen I, Prokollagen I, PDGF-Rezeptor- $\beta$ , Connexin 40 und NG2.

Die Funktionalität der hyperplastischen Reninzellen in  $AS^{-/-}$ -Nieren wurde im Modell der isoliert perfundierten Mausniere überprüft. Dabei zeigten sich

hinsichtlich der Stimulierbarkeit der Reninsekretion durch Katecholamine und der Hemmbarkeit durch Angiotensin II und den Perfusionsdruck sowie hinsichtlich der „paradoxen“ Wirkung von Kalzium keine auffälligen Unterschiede zu Wildtyp-Nieren, abgesehen von der stark erhöhten Absolutsekretion in AS<sup>-/-</sup>-Nieren.

Detailliert wurde weiterhin noch die Bedeutung des Connexin 40 für die Struktur und Funktion von Reninzellen in AS<sup>-/-</sup>-Mäusen untersucht, da Connexin 40 in normalen juxtaglomerulären Reninzellen wesentlich für die Lokalisation der Zellen und die Kontrolle der Reninsekretion ist. Zu diesem Ziel wurden Aldosteronsynthase-defiziente Mäuse untersucht, in denen zusätzlich das *Cx40*-Gen ausgeschaltet war (AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup>).

Deletion des *Cx40* Gens hatte in Aldosteronsynthase-defizienten Mäusen keinen Einfluss auf Anzahl und Morphologie der Reninzellen. Jedoch zeigten sich mit zunehmendem Alter Unterschiede in der Lokalisation der Reninzellen. Diese fanden sich in älteren AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup> Tieren verstärkt auch im Bereich der Bowman-Kapsel und des tubulären Interstitiums ohne dabei aber den Kontakt zu den perivaskulären Reninzellen zu verlieren. Im ältesten untersuchten Stadium (34 Wochen) fand sich außerdem ein deutlicher Rückgang der Renin-Produktion in 58 % der perivaskulären Reninzellfelder - ein Effekt der in der AS<sup>-/-</sup>-Maus nicht beobachtet werden konnte.

Hinsichtlich der untersuchten Marker-Proteine (s.o.) zeigten die Reninzellen von AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup>-Mäusen keine Unterschiede zu den Reninzellen von AS<sup>-/-</sup>-Mäusen.

Bei der Analyse der Renin-Sekretion in der isoliert perfundierten Mausniere wurden dagegen Unterschiede im Vergleich zur AS<sup>-/-</sup>-Maus deutlich. Die Deletion des *Cx40* Gens führte in AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup>-Mäusen dazu, dass die inhibitorische Wirkung des Perfusionsdruckes auf die Renin-Sekretion wie auch der paradoxe Effekt des Kalziums auf die Reninsekretion aufgehoben war. Dieselben Effekte beobachtete man auch bei der Analyse der Renin-Sekretion in der Cx40<sup>-/-</sup>-Maus.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass sich die perivaskulären Reninzellen der AS<sup>-/-</sup>-Maus nicht von vaskulären Reninzellen ableiten, sondern vielmehr mit extraglomerulären Mesangialzellen verwandt sind. Dennoch unterscheiden sie sich in wichtigen funktionellen Eigenschaften nicht von

den typischen Reninzellen der afferenten Arteriole. Auch die Relevanz von Connexin 40 für die Lokalisation der Zellen und die Regulation der Reninsekretion zeigte sich für perivaskuläre und vaskuläre Reninzellen in gleicher Weise.

## 6. Literaturverzeichnis

**Alund M (1980)** Juxtaglomerular cell activity during hemorrhage and ischemia as revealed by quinacrine histofluorescence. *Acta Physiol Scand* 110: 113–121

**Arensbak B, Mikkelsen HB, Gustafsson F, Christensen T, Holstein-Rathlou NH (2001)** Expression of connexin 37, 40, and 43 mRNA and protein in renal preglomerular arterioles. *Histochem Cell Biol* 115: 479–487

**Atchison DK, Beierwaltes WH (2013)** The influence of extracellular and intracellular calcium on the secretion of renin. *Pflugers Arch* 465(1): 59–69

**Barajas L (1970)** The ultrastructure of the juxtaglomerular apparatus as disclosed by three-dimensional reconstructions from serial sections. The anatomical relationship between the tubular and vascular components. *J Ultrastruct Res* 33(1):116–47

**Barajas L, Latta H (1963)** A three-dimensional study of the juxtaglomerular apparatus in the rat. Light and electron microscopic observations. *Lab Invest* 12:257–69

**Barajas L, Müller J (1973)** The innervation of the juxtaglomerular apparatus and surrounding tubules: a quantitative analysis by serial section electron microscopy. *J Ultrastruct Res* 43(1):107–32

**Barajas L, Salido E (1986)** Juxtaglomerular apparatus and the renin-angiotensin system. *Lab Invest* 54(4):361–364

**Barajas L, Wang P, Bennett CM, Wilburn RL (1976)** The renal sympathetic system and juxtaglomerular cells in experimental renovascular hypertension. *Lab Invest* 35(6):574–87

**Barrter FC, Pronove P, Gill JR, McCardle RC (1962)** Hyperplasia of the juxtaglomerular complex with hyperaldosteronism and hypokalemic alkalosis. *Amer J Med* 33: 811–828

**Baumbach L, Leyssac PP, Skinner SL (1976)** Studies on renin release from isolated superfused glomeruli: effects of temperature, urea, ouabain and ethacrynic acid. *J Physiol* 258:243–56

**Beavo JA (1995)** Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev* 75(4):725–48

- Beierwaltes WH (2010)** The role of calcium in the regulation of renin secretion. *Am J Physiol Renal Physiol* 298(1):F1-F11
- Berg AC, Chernavvsky-Sequeira C, Lindsey J, Gomez RA, Sequeira-Lopez ML (2013)** Pericytes synthesize renin. *World J Nephrol* 2(1): 11-16
- Berger S, Bleich M, Schmid W, Cole TJ, Peters J, Watanabe H, Kriz W, Warth R, Greger R, Schutz G (1995)** Mineralocorticoid receptor knockout mice: pathophysiology of Na<sup>+</sup> metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 9424–9429
- Berger S, Bleich M, Schmid W, Greger R, Schutz G (2000)** Mineralocorticoid receptor knockout mice: lessons on Na<sup>+</sup> metabolism. *Kidney Int* 57: 1295-1298
- Bohle A, Gärtner HV, Laberke HG, Krück F (1984)** Die Niere - Struktur und Funktion. *F. K. Schattauer Verlag GmbH, Stuttgart*
- Boivin V, Jahns R, Gambaryan S, Ness W, Boege F, and Lohse MJ (2001)** Immunofluorescent imaging of beta 1- and beta 2-adrenergic receptors in rat kidney. *Kidney Int* 59: 515-531
- Bosco D, Haefliger JA, Meda P (2011)** Connexins: key mediators of endocrine function. *Physiol Rev* 91(4): 1393-445
- Buhrle CP, Nobiling R, Mannek E, Schneider D, Hackenthal E, Taugner R (1984)** The afferent glomerular arteriole: immunocytochemical and electrophysiological investigations. *J Cardiovasc Pharmacol* 6, Suppl 2: S383–S393
- Cain H, Kraus B (1971)** Funktions- und Formwandel der Gefäßzellen des juxtaglomerulären Apparates der Niere beim Kaninchen. *Virchows Arch [A]* 7: 160-173
- Cantin M, Araujo-Nascimento M, Benchimol S, Desormeaux Y (1977)** Metaplasia of Smooth Muscle Cells Into Juxtaglomerular Cells in the Juxtaglomerular Apparatus, Arteries, and Arterioles of the Ischemic (Endocrine) Kidney. An Ultrastructural-Cytochemical and Autoradiographic Study. *Am J Pathol* 87(3): 581–602
- Carbone GM, Sheikh AU, Rogers S, et al. (1993):** Developmental changes in renin gene expression in ovine kidney cortex. *Am J Physiol* 264: R591-R596
- Carey RM, McGrath HE, Pentz ES, Gomez RA, Barrett PQ (1997)** Biomechanical coupling in renin-releasing cells. *J Clin Invest* 100: 1566-1574

**Castellanos Rivera RM, Monteagudo MC, Pentz ES, Glenn ST, Gross KW, Carretero O, Sequeira-Lopez ML, Gomez RA (2011)** Transcriptional regulator RBP-J regulates the number and plasticity of renin cells. *Physiol Genomics* 43(17): 1021-8

**Castrop H, Huang Y, Hashimoto S, Mizel D, Hansen P, Theilig F, Bachmann S, Deng C, Briggs J, Schnermann J (2004)** Impairment of tubuloglomerular feedback regulation of GFR in ecto-5'- nucleotidase/CD73-deficient mice. *J Clin Invest* 114(5): 634-42

**Castrop H, Höcherl K, Kurtz A, Schweda F, Todorov V, Wagner C (2010)** Physiology of Kidney Renin. *Physiol Rev* 90: 607–673

**Celio MR, Groscurth P, Inagami T (1985)** Ontogeny of renin immunoreactive cells in the human kidney. *Anat Embryol* 173: 149–155

**Chao HH, Waheed A, Pohlmann R, Hille A, von Figura K (1990)** Mannose 6-phosphate receptor dependent secretion of lysosomal enzymes. *EMBO J* 9(11): 3507-13

**Chen K, Carey LC, Valego NK, Rose JC (2007 a)** Thyroid hormone replacement normalizes renal renin and angiotensin receptor expression in thyroidectomized fetal sheep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293: R701-R706

**Chen L, Kim SM, Oppermann M, Faulhaber-Walter R, Huang Y, Mizel D, Chen M, Lopez ML, Weinstein LS, Gomez RA, Briggs JP, Schnermann J (2007 b)** Regulation of renin in mice with Cre recombinase-mediated deletion of G protein Gsalpha in juxtaglomerular cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 292: F27–F37

**Chomczynski P, Sacchi N (1987)** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159

**Chow RH (2004)** Real-time imaging of renin release in vitro. *Am J Physiol Renal Physiol* 287: F329–F335

**Christensen JA, Bohle A, Mikeler E, Taugner R (1989)** Renin-positive granulated Goormaghtigh cells. Immunohistochemical and electron-microscopic studies on biopsies from patients with pseudo-Bartter syndrome. *Cell Tissue Res* 255(1): 149-53



**Churchill PC, Churchill MC (1982)** Isoproterenol-stimulated renin secretion in the rat: second messenger roles of Ca and cyclic AMP. *Life Sci* 30: 1313–1319

**Cohen Y, Rahamimov R, Naveh-Many T, Silver J, Rahamimoff R (1997)** Where is the “inverting factor” in hormone secretion from parathyroid cells? *Am J Physiol Endocrinol Metab* 273: E631-E637

**Cole TJ, Blendy JA, Monaghan P, Krieglstein K, Schmid W, Aguzzi A, Fantuzzi G, Hummler E, Unsicker K, Schütz G (1995)** Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation. *Genes Dev* 9: 1608–1621

**Davis JO, Freeman RH (1976)** Mechanisms regulating renin release. *Physiol Rev* 56: 1–56

**Della Bruna R, Kurtz A, Corvol P, Pinet F (1993)** Renin mRNA quantification using polymerase chain reaction in cultured juxtaglomerular cells. Short-term effects of cAMP on renin mRNA and secretion. *Circ Res* 73: 639–648

**Desch M, Schreiber A, Schweda F, et al. (2010)** Increased renin production in mice with deletion of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  in juxtaglomerular cells. *Hypertension* 55: 660–666

**Deschepper CF, Mellon SH, Cumin F, et al. (1986)** Analysis by immunocytochemistry and in situ hybridization of renin and its mRNA in kidney, testis, adrenal, and pituitary of the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 83(19): 7552-7556

**De Vriese AS, Van de Voorde J, Lameire NH (2002)** Effects of connexin-mimetic peptides on nitric oxide synthase- and cyclooxygenase-independent renal vasodilation. *Kidney Int* 61:177–185

**De Wit C, Roos F, Bolz SS, Pohl U (2003)** Lack of vascular connexin 40 is associated with hypertension and irregular arteriolar vasomotion. *Physiol Genomics* 13: 169–177

**Dodge AH (1993)** Sites of renin production in fetal, neonatal and postnatal Syrian hamster kidneys. *Anat Rec* 235: 144-150

**Drukker A, Donoso VS, Linshaw MA, et al. (1983)** Intrarenal distribution of renin in the developing rabbit. *Pediatr Res* 17:762-765

- Dunihue FW, Boldosser WG (1963)** Observations on the similarity of mesangial to juxtaglomerular cells. *Labs Invest* 12: 1228-1240
- Egerer G, Taugner R, Tiedemann K (1984)** Renin immunocytochemistry in the mesonephros and metanephros of the pig embryo. *Histochemistry* 81: 385-390
- Esther CR Jr, Howard TE, Marino EM, Goddard JM, Capecchi MR, Bernstein KE (1996)** Mice lacking angiotensin-converting enzyme have low blood pressure, renal pathology, and reduced male fertility. *Lab Invest* 74: 953-965
- Everett AD, Carey RM, Chevalier RL, et al. (1990)** Renin release and gene expression in intact rat kidney microvessels and single cells. *J Clin Invest* 86: 169-175
- Faarup P (1965)** On the morphology of the juxtaglomerular apparatus *Acta Anatomica* 60: 20-38
- Farman N, Bocchi B (2000)** Mineralocorticoid selectivity: molecular and cellular aspects. *Kidney Int* 57: 1364-1369
- Faust PL, Chirgwin JM, Kornfeld S (1987)** Renin, a secretory glycoprotein, acquires phosphomannosyl residues. *J Cell Biol* 105(5): 1947-55
- Fray JCS, Lush DJ (1976)** Stretch receptor model for renin release with evidence from perfused rat kidney. *Am J Physiol* 231, 936-944
- Fray JC, Park CS (1986)** Forskolin and calcium: interactions in the control of renin secretion and perfusate flow in the isolated rat kidney. *J Physiol* 375: 361-375
- Friis UG, Jensen BL, Aas JK, Skott O (1999)** Direct demonstration of exocytosis and endocytosis in single mouse juxtaglomerular cells. *Circ Res* 84: 929-936
- Friis UG, Jensen BL, Sethi S, Andreassen D, Hansen PB, Skott O (2002)** Control of renin secretion from rat juxtaglomerular cells by cAMP-specific phosphodiesterases. *Circ Res* 90: 996-1003
- Friis UG, Madsen K, Stubbe J, Hansen PB, Svenningsen P, Bie P, Skøtt O, Jensen BL (2013)** Regulation of renin secretion by renal juxtaglomerular cells. *Pflugers Arch* 465(1):25-37

- Friis UG, Stubbe J, Uhrenholt TR, Svenningsen P, Nusing RM, Skøtt O, Jensen BL (2005)** Prostaglandin E2 EP2 and EP4 receptor activation mediates cAMP-dependent hyperpolarization and exocytosis of renin in juxtaglomerular cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 289: F989–F997
- Gambaryan S, Wagner C, Smolenski A et al. (1998)** Endogenous or overexpressed cGMP-dependent protein kinases inhibit cAMP-dependent renin release from rat isolated perfused kidney, microdissected glomeruli and isolated juxtaglomerular cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 9003-9008
- Gerl M, Kurt B, Kurtz A, Wagner C (2014)** Connexin 43 is not essential for the control of renin synthesis and secretion. *Pflugers Arch* 466(5): 1003-9
- Gill JR, Barrter FC (1978)** Evidence for a prostaglandin-independent defect in chloride reabsorption in the loop of Henle as a proximal cause of Barrter's syndrome. *Amer J Med* 65: 766-772
- Glenn ST, Jones CA, Pan L, Gross KW (2008)** In vivo analysis of key elements within the renin regulatory region. *Physiol Genomics* 35: 243–253
- Glynn Webb D (1968)** The postnatal development of the kidney in the albino mouse. *Department of biological sciences, University of Arizona*
- Gomez RA (1998)** Role of Angiotensin in renal vascular development. *Kidney Int* 54: 12-16
- Gomez RA, Belyea B, Medrano S, Pentz ES, Sequeira-Lopez ML (2014)** Fate and plasticity of renin precursors in development and disease. *Pediatr Nephrol* 29(4): 721-6
- Gomez RA, Chevalier RL, Everett AD, Elwood JP, Peach MJ, Lynch KR, Carey RM (1990)** Recruitment of renin gene-expressing cells in adult rat kidneys. *Am J Physiol* 259:F660–F665
- Goormaghtigh N (1937)** L'appareil neuromyo-arteriel juxtaglomerulaire du renin; ses reactions en pathologie et ses rapports avec le tube urinifere. *C R Soc Biol* 124: 293-296

**Graham PC, Kingdom JC, Raweily EA, et al. (1992)** Distribution of renin-containing cells in the developing human kidney: an immunocytochemical study. *Br J Obstet Gynaecol* 99: 765-769

**Greenberg SG, He XR, Schnermann JB, Briggs JP (1995)** Effect of nitric oxide on renin secretion. I. Studies in isolated juxtaglomerular granular cells. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 268: F948–F952

**Grünberger C, Obermayer B, Klar J, Kurtz A, Schweda F (2006)** The calcium paradoxon of renin release: Calcium suppresses renin exocytosis by inhibition of calcium-dependent adenylate cyclases AC5 and AC6. *Circ Res* 99: 1197–206

**Guron G, Friberg P (2000)** An intact renin-angiotensin system is a prerequisite for normal renal development. *J Hypertens* 18: 123-137

**Hackenthal E, Paul M, Ganten D, Taugner R (1990)** Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. *Physiol Rev* 70: 1067- 1116

**Haefliger JA, Demotz S, Braissant O, Suter E, Waeber B, Nicod P, Meda P (2001)** Connexins 40 and 43 are differentially regulated within the kidneys of rats with renovascular hypertension. *Kidney Int* 60: 190–201

**Haefliger JA, Krattinger N, Martin D, Pedrazzini T, Capponi A, Döring B, Plum A, Charollais A, Willecke K, Meda P (2006)** Connexin43-dependent mechanism modulates renin secretion and hypertension. *J Clin Invest* 116: 405–413

**Haefliger JA, Nicod P, Meda P (2004)** Contribution of connexins to the function of the vascular wall. *Cardiovasc Res* 62: 345–356

**Hanner F, Sorensen CM, Holstein-Rathlou NH, Peti-Peterdi J (2010)** Connexins and the kidney. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 298(5): R1143-55

**Hano T, Shiotani M, Baba A, Ura M, Nakamura Y, et al. (1990)** Contribution of calmodulin and protein kinase C to renin release in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 3: S206–9

**Harris RC, McKanna JA, Akai Y, Jacobson HR, Dubois RN, Breyer MD (1994)** Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. *J Clin Invest* 94(6): 2504-10

**Hautmann M, Friis UG, Desch M, Todorov V, Castrop H, Segerer F, Otto C, Schutz G, Schweda F (2007)** Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates renin secretion via activation of PAC1 receptors. *J Am Soc Nephrol* 18: 1150–1156

**Henrich WL, McAllister EA, Smith PB, Campbell WB (1988)** Guanosine 3, 5\_-cyclic monophosphate as a mediator of inhibition of renin release. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 255: F474–F478

**Hilgers KF, Reddi V, Krege JH, Smithies O, Gomez RA (1997)** Aberrant renal vascular morphology and renin expression in mutant mice lacking angiotensin-converting enzyme. *Hypertension* 29: 216–221

**Höcherl K, Wolf K, Castrop H, Ittner KP, Bucher M, Kees F, Grobecker HF, Kurtz A (2001)** Renocortical expression of renin and of cyclooxygenase-2 in response to angiotensin II  $AT_1$  receptor blockade is closely coordinated but not causally linked. *Pflügers Arch* 442: 821–827

**Hwan Seul K, Beyer EC (2000)** Heterogeneous localization of connexin40 in the renal vasculature. *Microvasc Res* 59: 140–148

**Hugo C, Shankland SJ, Bowen-Pope DF, Couser WG, Johnson RJ (1997)** Extraglomerular origin of the mesangial cell after injury. A new role of the juxtaglomerular apparatus. *J Clin Invest* 100(4): 786–94

**Hunt MK, Ramos SP, Geary KM, Norling LL, Peach MJ, Gomez RA, Carey RM (1992)** Colocalization and release of angiotensin and renin in renal cortical cells. *Am J Physiol* 263: F363–F373

**Humphreys BD, Lin SL, Kobayashi A, Hudson TE, Nowlin BT, Bonventre JV, Valerius MT, McMahon AP, Duffield JS (2010)** Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Am J Pathol* 176: 85–97

**Ichihara A, Suzuki H, Murakami M, Naitoh M, Matsumoto A, Saruta T (1995)** Interactions between angiotensin II and norepinephrine on renin release by juxtaglomerular cells. *Eur J Endocrinol* 133: 569–77

- Imanishi M, Tsuji T, Nakamura S, Takamiya M (2001)** Prostaglandin I(2)/E(2) ratios in unilateral renovascular hypertension of different severities. *Hypertension* 38: 23–29
- Inokuchi S, Kimura K, Sugaya T, Inokuchi K, Murakami K, Sakai T (2001)** Hyperplastic vascular smooth muscle cells of the intrarenal arteries in angiotensin II type 1a receptor null mutant mice. *Kidney Int* 60: 722–731
- Itani H, Liu X, Sarsour EH, et al. (2009)** Regulation of renin gene expression by oxidative stress. *Hypertension* 53: 1070–1076
- Jensen BL, Krämer BK, Kurtz A (1997 a)** Adrenomedullin stimulates renin release and renin mRNA in mouse juxtaglomerular granular cells. *Hypertension* 29(5): 1148–55
- Jensen BL, Rasch R, Nyengaard JR, Skott O (1997 b)** Giant renin secretory granules in beige mouse renal afferent arterioles. *Cell Tissue Res* 288: 399–406
- Jensen BL, Schmid C, Kurtz A (1996)** Prostaglandins stimulate renin secretion and renin mRNA in mouse renal juxtaglomerular cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 271: F659–F669
- Johnson JA, Davis JO, Baumber JS, Schneider EG (1971)** Effects of hemorrhage and chronic sodium depletion on hepatic clearance of renin. *Am J Physiol* 220: 1677–1682
- Jutras I, Reudelhuber TL (1999)** Prorenin processing by cathepsin B in vitro and in transfected cells. *FEBS Lett* 443: 48–52
- Kageyama S, Brown J (1990)** Effect of atrial natriuretic peptide on renin release in rat isolated Glomeruli. *Biochem Biophys Res Commun* 168: 37–42
- Karger C, Kurtz F, Steppan D, Schwarzensteiner I, Machura K, Angel P, Banas B, Risteli J, Kurtz A (2013)** Procollagen I-expressing renin cell precursors. *Am J Physiol Renal Physiol* 305(3): F355–61
- Keeton TK, Campbell WB (1980)** The pharmacologic alteration of renin release. *Pharmacol Rev* 32: 81–227
- Kihara M, Umemura S, Sumida Y, Yokoyama N, Yabana M, Nyui N, Tamura K, Murakami K, Fukamizu A, Ishii M (1998)** Genetic deficiency of angiotensinogen produces an impaired urine concentrating ability in mice. *Kidney Int* 53: 548–555

- Kim SM, Chen L, Faulhaber-Walter R, Oppermann M, Huang Y, Mizel D, Briggs JP, Schnermann J (2007)** Regulation of renin secretion and expression in mice deficient in beta1- and beta2-adrenergic receptors. *Hypertension* 50: 103–109
- Kim HS, Krege JH, Kluckman KD, Hagaman JR, Hodgin JB, Best CF, Jennette JC, Coffman TM, Maeda N, Smithies O (1995)** Genetic control of blood pressure and the angiotensinogen locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 2735–2739
- Kirchhoff S, Nelles E, Hagendorff A, Krüger O, Traub O, Willecke K (1998)** Reduced cardiac conduction velocity and predisposition to arrhythmias in connexin40-deficient mice. *Curr Biol* 8(5):299-302
- Klar J, Vitzthum H, and Kurtz A (2004)** Aldosterone enhances renin gene expression in juxtaglomerular cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 286: F349-355
- Kon Y, Hashimoto Y, Kitagawa H, et al. (1989)** An immunohistochemical study on the embryonic development of renin-containing cells in the mouse and pig. *Anat Histol Embryol* 18: 14-26
- Krattinger N, Capponi A, Mazzolai L, Aubert JF, Caille D, Nicod P, Waeber G, Meda P, Haefliger JA (2007)** Connexin40 regulates renin production and blood pressure. *Kidney Int* 72: 814–822
- Krege JH, John SW, Langenbach LL, Hodgin JB, Hagaman JR, Bachman ES, Jennette JC, O'Brien DA, Smithies O (1995)** Male–female differences in fertility and blood pressure in ACE-deficient mice. *Nature* 375:146–148
- Kurtz A (1989)** Cellular control of renin secretion. *Rev Physiol Biochem Pharmac* 113: 2-40
- Kurtz A (2011)** Renin release: sites, mechanisms, and control. *Annu Rev Physiol* 73: 377-99
- Kurtz A (2012)** Renal connexins and blood pressure. *Biochim Biophys Acta* 1818(8): 1903–1908
- Kurtz A, Della Bruna R, Pfeilschifter J, Bauer C (1986)** Atrial natriuretic peptide inhibits renin release from juxtaglomerular cells by a cGMP-mediated process. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 4769-4773



**Kurtz A, Della Bruna R, Pratz J, Caverio I (1988 a)** Rat juxtaglomerular cells are endowed with DA-1 dopamine receptors mediating renin release. *J Cardiovasc Pharmacol* 12: 658–663

**Kurtz A, Kaissling B, Busse R, Baier W (1991)** Endothelial cells modulate renin secretion from isolated mouse juxtaglomerular cells. *J Clin Invest* 88: 1147–1154

**Kurtz A, Muff R, Born W, Lundberg JM, Milberg BI, Gnädiger MP, Uehlinger DE, Weidmann P, Hökfelt T, Fischer JA (1988 b)** Calcitonin gene-related peptide is a stimulator of renin secretion. *J Clin Invest* 82: 538–543

**Kurtz A, Penner R (1989)** Angiotensin II induces oscillations of intracellular calcium and blocks anomalous inward rectifying potassium current in mouse renal juxtaglomerular cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 3423

**Kurtz A, Pfeilschifter J, Bauer C (1984)** Is renin secretion governed by the calcium permeability of the juxtaglomerular cell membrane? *Biochem Biophys Res Commun* 124: 359–366

**Kurtz A, Pfeilschifter J, Hutter A, Buhrle C, Nobiling R, et al. (1986)** Role of protein kinaseC in inhibition of renin release caused by vasoconstrictors. *Am J Physiol Cell Physiol* 250: 563–71

**Kurtz A, Wagner C (1998)** Role of nitric oxide in the control of renin secretion. *Am J Physiol* 275: 849–862

**Kurtz A, Wagner C (1999)** Regulation of renin secretion by angiotensin II-AT1 receptors. *J Am Soc Nephrol* 10 Suppl 11: S162–168

**Kurtz L, Gerl M, Kriz W, Wagner C, Kurtz A (2009 a)** Replacement of connexin 40 by connexin 45 causes ectopic localization of renin-producing cells in the kidney but maintains in vivo control of renin gene expression. *Am J Physiol Renal Physiol* 297: F403–409

**Kurtz L, Janssen-Bienhold U, Kurtz A, Wagner C (2009 b)** Connexin expression in renin-producing cells. *J Am Soc Nephrol* 20: 506–512

**Kurtz L, Schweda F, de Wit C, Kriz W, Witzgall R, Warth R, Sauter A, Kurtz A, Wagner C (2007)** Lack of connexin 40 causes displacement of renin-producing cells from afferent arterioles to the extraglomerular mesangium. *J Am Soc Nephrol* 18: 1103–1111

**Laframboise M, Reudelhuber TL, Jutras I, Brechler V, Seidah NG, Day R, Gross KW, Deschepper CF (1997)** Prorenin activation and prohormone convertases in the mouse As4.1 cell line. *Kidney Int* 51: 104-109

**Latta H (1973)** Ultrastructure of the glomerulus and juxtaglomerular apparatus. In: Handbook of Physiology. Renal Physiology. *Washington, DC: Am Physiol Soc* sect. 8, chapt. 1, p.1-29

**Lee G, Makhanova N, Caron K, Lopez ML, Gomez RA, Smithies O, Kim HS. (2005)** Homeostatic responses in the adrenal cortex to the absence of aldosterone in mice. *Endocrinology* 146(6):2650-6

**Li A, Banerjee J, Leung CT, Peterson-Yantorno K, Stamer WD, Civan MM (2011)** Mechanisms of ATP release, the enabling step in purinergic dynamics. *Cell Physiol Biochem* 28:1135–1144

**Lin SL, Kisseleva T, Brenner DA, Duffield JS (2008)** Pericytes and perivascular fibroblasts are the primary source of collagen-producing cells in obstructive fibrosis of the kidney. *Am J Pathol* 173(6): 1617-27

**Liu F, Arce FT, Ramachandran S, Lal R (2006)** Nanomechanics of hemichannel conformations: connexin flexibility underlying channel opening and closing. *J Biol Chem* 281: 23207–23217

**Lopez ML, Gomez RA (2010)** The renin phenotype: roles and regulation in the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 19(4):366-71

**Machura K, Neubauer B, Steppan D, Kettl R, Grobota A, and Kurtz A (2012)** Role of blood pressure in mediating the influence of salt intake on renin expression in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 302: F1278-1285

**Madsen K, Friis UG, Gooch JL, Hansen PB, Holmgaard L, et al. (2010)** Inhibition of calcineurin phosphatase promotes exocytosis of renin from juxtaglomerular cells. *Kidney Int* 77: 110–17

**Makhanova N, Lee G, Takahashi N, Sequeira Lopez ML, Gomez RA, Kim HS, Smithies O (2006)** Kidney function in mice lacking aldosterone. *Am J Physiol Renal Physiol* 290: F61-69

- Matsushita K, Morello F, Wu Y, Zhang L, Iwanaga S, Pratt RE, Dzau VJ (2010)** Mesenchymal stem cells differentiate into renin-producing juxtaglomerular (JG)-like cells under the control of liver X receptor- $\alpha$ . *J Biol Chem* 285(16): 11974-82
- McGowan RA, Kane-Haas C, Gross KW (1980)** High resolution, low exposure times for insitu hybridization using  $^{35}\text{S}$ -labeled SP6 probe. *N Engl Nuclear Products News* 4(5): 1
- Medrano S, Monteagudo MC, Sequeira-Lopez ML, Pentz ES, Gomez RA (2012)** Two microRNAs, miR-330 and miR-125b-5p, mark the juxtaglomerular cell and balance its smooth muscle phenotype. *Am J Physiol Renal Physiol* 302: F29-F37
- Mercure C, Ramla D, Garcia R, et al. (1998)** Evidence for intracellular generation of angiotensin II in rat juxtaglomerular cells. *FEBS Lett* 422(3): 395-399
- Mink D, Schiller A, Kriz W, Taugner R (1984)** Interendothelial junctions in kidney vessels. *Cell Tissue Res* 236: 567-576
- Minuth M, Hackenthal E, Poulsen K, Rix E, Taugner R (1981)** Renin immunocytochemistry of the differentiating juxtaglomerular apparatus. *Anat Embryol* 162: 173-181
- Morris BJ (1992)** Molecular biology of renin I: gene and protein structure, synthesis and processing. *J Hypertens* 10: 209-214
- Mullins LJ, Payne CM, Kotelevtseva N, Brooker G, Fleming S, Harris S, Mullins JJ (2000)** Granulation rescue and developmental marking of juxtaglomerular cells using "piggy-BAC" recombination of the mouse ren locus. *J Biol Chem* 275: 40378-40384
- Mundel P, Bachmann S, Bader M, Fischer A, Kummer W, Mayer B, Kriz W (1992)** Expression of nitric oxide synthase in kidney macula densa cells. *Kidney Int* 42(4): 1017-1019
- Nafz B, Berthold H, Ehmke H, Hackenthal E, Kirchheim HR, Persson PB (1997)** Flow versus pressure in the control of renin release in conscious dogs. *Am J Physiol* 273: F200-205

- Nagata M, Tanimoto K, Fukamizu A, Kon Y, Sugiyama F, Yagami K, Murakami K, Watanabe T (1996)** Nephrogenesis and renovascular development in angiotensinogen-deficient mice. *Lab Invest* 75(5): 745-53
- Nakamura N, Soubrier F, Menard J, Panthier JJ, Rougeon F, Corvol P (1985)** Nonproportional changes in plasma renin concentration, renal renin content and rat renin messenger RNA. *Hypertension* 7: 855-859
- Neubauer B, Machura K, Schnermann J, Wagner C (2011)** Renin expression in large renal vessels during fetal development depends on functional beta1/beta2-adrenergic receptors. *Am J Physiol Renal Physiol* 301(1): F71-7
- Neves FA, Duncan KG, Baxter JD (1996)** Cathepsin B is a prorenin processing enzyme. *Hypertension* 27: 514-517
- Niimura F, Labosky PA, Kakuchi J, Okubo S, Yoshida H, Oikawa T, Ichiki T, Naftilan AJ, Fogo A, Inagami T (1995)** Gene targeting in mice reveals a requirement for angiotensin in the development and maintenance of kidney morphology and growth factor regulation. *J Clin Invest* 96:2947-2954
- Noble AR, Abu-Kishk RA, D'Aloia MA, Williams BC, Lush DJ (1994)** Cyclic GMP-linked pathway for renin secretion. *Kidney Int* 46: 1588-1590
- Oberling, C, Hatt PY (1960 a)** Ultrastructure de l'appareil juxtaglomérulaire du rat. *Compt rend Acad Sc* 250, 929
- Oberling, C, Hatt PY (1960 b)** Étude de l'appareil juxtaglomérulaire du rat au microscope électronique. *Annales d'anatomie pathologique* 5, 441
- Oliverio MI, Kim HS, Ito M, Le T, Audoly L, Best CF, Hiller S, Kluckman K, Maeda N, Smithies O, Coffman TM (1998)** Reduced growth, abnormal kidney structure, and type 2 (AT2) angiotensin receptor-mediated blood pressure regulation in mice lacking both AT1A and AT1B receptors for angiotensin II. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 15496-15501
- Ortiz-Capisano MC, Ortiz PA, Harding P, Garvin JL, Beierwaltes WH (2007)** Adenylyl cyclase isoform V mediates renin release from juxtaglomerular cells. *Hypertension* 49: 618-24
- O'Shaughnessy KM, Karet FE (2004)** Salt handling and hypertension. *J Clin Invest* 113: 1075-1081

- Owen RA, Molon-Noblot S, Hubert MF, Kindt MV, Keenan KP, Eydeloth RS (1994)** The morphology of juxtaglomerular cell hyperplasia and hypertrophy in normotensive rats and monkeys given an angiotensin II receptor antagonist. *Toxicol Pathol* 22(6): 606-19
- Pentz ES, Moyano MA, Thornhill BA, Sequeira Lopez ML, Gomez RA (2004)** Ablation of renin-expressing juxtaglomerular cells results in a distinct kidney phenotype. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286: R474–R483
- Pentz ES, Sequeira Lopez ML, Cordaillat M, Gomez RA (2008)** Identity of the renin cell is mediated by cAMP and chromatin remodeling: an in vitro model for studying cell recruitment and plasticity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294: H699–H707
- Peters JS, Clausmeyer S (2002)** Intracellular sorting of renin: Cell type specific differences and their consequences. *J Mol Cell Cardiol* 34: 1561-1568
- Peti-Peterdi J, Fintha A, Fuson AL, Tousson A, Chow RH (2004)** Real-time imaging of renin release in vitro *Am J Physiol Renal Physiol* 287: F329-F335
- Peti-Peterdi J, Harris RC (2010)** Macula densa sensing and signaling mechanisms of renin release. *J Am Soc Nephrol* 21(7): 1093-6
- Petrovic N, Kane CM, Sigmund CD, Gross KW (1997)** Downregulation of renin gene expression by interleukin-1. *Hypertension* 30(2 Pt 1): 230-5
- Pfeilschifter J, Kurtz A, Bauer C (1985)** Inhibition of renin secretion by platelet activating factor (acetylglycerol ether phosphorylcholine) in cultured rat renal juxtaglomerular cells. *Biochem Biophys Res Commun* 127(3): 903-10
- Phat VN, Camilleri JP, Bariety J, et al. (1981)** Immunohistochemical characterization of renin-containing cells in the human juxtaglomerular apparatus during embryonal and fetal development. *Lab Invest* 45: 387-390
- Pietri L, Bloch-Faure M, Belair MF, Sanford LP, Doetschman T, Menard J, Bruneval P, Meneton P (2002)** Altered renin synthesis and secretion in the kidneys of heterozygous mice with a null mutation in the TGF-beta(2) gene. *Exp Nephrol* 10(5-6): 374-382

**Pippin JW, Glenn ST, Krofft RD, Rusiniak ME, Alpers CE, Hudkins K, Duffield JS, Gross KW, Shankland SJ (2014)** Cells of renin lineage take on a podocyte phenotype in aging nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 306(10): F1198-209

**Pippin JW, Sparks MA, Glenn ST, Buitrago S, Coffman TM, Duffield JS, Gross KW, Shankland SJ (2013)** Cells of renin lineage are progenitors of podocytes and parietal epithelial cells in experimental glomerular disease. *Am J Pathol* 183(2): 542-57

**Prieto-Carrasquero MC, Botros FT, Kobori H, Navar LG (2009)** Collecting duct renin: a major player in angiotensin II-dependent hypertension. *J Am Soc Hypertens* 3: 96-104

**Rasch R, Jensen BL, Nyengaard JR, Skøtt O (1998)** Quantitative changes in rat renin secretory granules after acute and chronic stimulation of the renin system. *Cell Tissue Res* 292: 563-571

**Ravier MA, Guldenagel M, Charollais A, Gjinovci A, Caille D, Sohl G, Wollheim CB, Willecke K, Henquin JC, Meda P (2005)** Loss of connexin36 channels alters beta-cell coupling, islet synchronization of glucose-induced Ca<sup>2+</sup> and insulin oscillations, and basal insulin release. *Diabetes* 54: 1798-1807

**Reid IA, and Chiu YJ (1995)** Nitric oxid and the control of renin secretion. *Fund Clin Pharmac* 9: 309-323.

**Richoux JP, Amsaguine S, Grignon G, Bouhnik J, Menard J, Corvol P (1987)** Earliest renin containing cell differentiation during ontogenesis in the rat. An immunocytochemical study. *Histochemistry* 88: 41-46

**Riemenschneider T, Bohle A (1983)** Morphological aspects of low-potassium and low-sodium nephropathy. *Clin Nephrol* 19: 271-279

**Romero JC, Lahera V, Salom MG, and Biondi ML (1992)** Role of the endothelium-dependent relaxing factor nitric oxid on renal function. *J Am Soc Nephrol* 2: 1371-1387

**Ryan MJ, Gross KW, Hajduczuk G (2000)** Calcium-dependent activation of phospholipase C by mechanical distension in renin-expressing As4.1 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279(4): E823-9

- Sauter A, Machura K, Neubauer B, Kurtz A, Wagner C (2008)** Development of renin expression in the mouse kidney. *Kidney Int* 73(1): 43-51
- Scholz H, Hamann M, Gotz KH, Kurtz A (1994)** Role of calcium ions in the pressure control of renin secretion from the kidneys. *Pflüg Arch* 428: 173-78
- Scholz H, Kramer BK, Hamann M, Gotz KH, Kurtz A (1995)** Effects of endothelins on renin secretion from rat kidneys. *Acta Physiol Scand* 155(2): 173-82
- Schricker K, Kurtz A (1995)** Role of membrane-permeable ions in renin secretion by renal juxtaglomerular cells. *Am J Physiol Ren Physiol* 269: 64-69
- Schweda F, Friis U, Wagner C, Skott O, Kurtz A (2007)** Renin Release. *Physiology* 22: 310-319
- Schweda F, Kurtz L, de Wit C, Janssen-Bienhold U, Kurtz A, Wagner C (2009)** Substitution of connexin40 with connexin45 prevents hyperreninemia and attenuates hypertension. *Kidney Int* 75: 482-489
- Schweda F, Riegger GA, Kurtz A, Kramer BK (2000)** Storeoperated calcium influx inhibits renin secretion. *Am J Physiol Renal Physiol* 279: F170-176
- Schweda F, Wagner C, Krämer BK, Schnermann J, Kurtz A (2003)** Preserved macula densa-dependent renin secretion in A1 adenosine receptor knockout mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 284(4):F770-7
- Schwertschlag U, Hackenthal E (1982)** Histamine stimulates renin release from the isolated perfused rat kidney. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* 319: 239-242
- Sequeira Lopez ML, Gomez RA (2011)** Development of the renal arterioles. *J Am Soc Nephrol* 22(12): 2156-65
- Sequeira Lopez ML, Pentz ES, Nomasa T, Smithies O, Gomez RA (2004)** Renin cells are precursors for multiple cell types that switch to the renin phenotype when homeostasis is threatened. *Dev Cell* 6: 719-728
- Sequeira Lopez ML, Pentz ES, Robert B, Abrahamson DR, Gomez RA (2001)** Embryonic origin and lineage of juxtaglomerular cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 281: F345-F356



**Sequeira-Lopez ML, Weatherford ET, Borges GR, Monteagudo MC, Pentz ES, Harfe BD, Carretero O, Sigmund CD, Gomez RA (2010)** The microRNA-processing enzyme dicer maintains juxta-glomerular cells. *J Am Soc Nephrol* 21: 460-467

**Simon AM, McWhorter AR (2003)** Decreased intercellular dye-transfer and downregulation of non-ablated connexins in aortic endothelium deficient in connexin37 or connexin40. *J Cell Sci* 116: 2223– 2236

**Snyder PM, Olson DR, and Thomas BC (2002)** Serum and glucocorticoid-regulated kinase modulates Nedd4-2-mediated inhibition of the epithelial Na-channel. *J Biol Chem* 277: 5–8

**Sohl G, Willecke K (2004)** Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res* 62: 228–232

**Sorensen CM, Holstein-Rathlou NH (2012)** Cell–cell communication in the kidney microcirculation. *Microcirculation* 19(5):451-60

**Spindler B, Mastroberardion L, Custer M and Verrey F (1997)** Characterisation of early aldosterone- induced RNAs identified in A6 kidney epithelia. *Pflügers Arch* 434: 323-331

**Steppan D, Zügner A, Rachel R, Kurtz A (2013)** Structural analysis suggests that renin is released by compound exocytosis. *Kidney Int* 83(2): 233-41

**Stockand JD (2002)** New ideas about aldosterone signaling in epithelia. *Am J Physiol* 282: F559–F576

**Takagi M, Matsuoka H, Atarashi K, Yagi S (1988)** Endothelin: a new inhibitor of renin release. *Biochem Biophys Res Commun* 157: 1164–68

**Takahashi N, LopezML, Cowhig JE Jr, Taylor MA, Hatada T, Riggs E, Lee G, Gomez RA, Kim HS, Smithies O (2005)** Ren1c homozygous null mice are hypotensive and polyuric, but heterozygotes are indistinguishable from wild-type. *J Am Soc Nephrol* 16: 125–132

**Takenaka T, Inoue T, Kanno Y, Okada H, Meaney KR, Hill CE, Suzuki H (2008)** Expression and role of connexins in the rat renal vasculature. *Kidney Int* 73: 415–422

- Tamura K, Umemura S, et al. (1995)** Recent advances in the study of renin and angiotensin genes: from molecules to the whole body. *Hypertens Res* 18(1): 7-18
- Taugner R, Buhrle CP, Nobiling R (1984 a)** Ultrastructural changes associated with renin secretion from the juxtaglomerular apparatus of mice. *Cell Tissue Res* 237: 459-47
- Taugner R, Hackenthal E (1989)** The juxtaglomerular apparatus: structure and function. *Springer, Berlin, Heidelberg, New York*
- Taugner R, Hackenthal E, Nobiling R, Harlacher M, Reb G (1981)** The distribution of renin in the different segments of the renal arterial tree: immunocytochemical investigation in the mouse kidney. *Histochemistry* 73(1):75-88
- Taugner R, Kim SJ, Murakami K, Waldherr R (1987)** The fate of prorenin during granulopoiesis in epitheloid cells. Immunocytochemical experiments with antisera against renin and different portions of the renin prosegment. *Histochemistry* 86(3): 249-53
- Taugner R, Kirchheim H, Forssmann WG (1984 b)** Myoendothelial contacts in glomerular arterioles, and in renal interlobular arteries of rat, mouse and *Tupaia belangeri*. *Cell Tissue Res* 235: 319-325.
- Taugner R, Nobiling R, Metz R, Taugner F, Buhrle C, Hackenthal E. (1988)** Hypothetical interpretation of the calcium paradox in renin secretion. *Cell Tissue Res* 252: 687-90
- Taugner C, Poulsen K, Hackenthal E, et al. (1979)** Immunocytochemical localization of renin in mouse kidney. *Histochemistry* 62(1): 19-27
- Taugner R, Schiller A, Kaissling B, Kriz W (1978)** Gap junctional coupling between the JGA and the glomerular tuft. *Cell Tissue Res* 186: 279-285
- Todorov V, Muller M, Schweda F, Kurtz A (2002)** Tumor necrosis factor-alpha inhibits renin gene expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283(5): R1046-51
- Toma I, Bansal E, Meer EJ, Kang JJ, Vargas SL, Peti-Peterdi J (2008)** Connexin 40 and ATP-dependent intercellular calcium wave in renal glomerular endothelial cells. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294: R1769-1776

**Tsuchida S, Matsusaka T, Chen X, Okubo S, Niimura F, Nishimura H, Fogo A, Utsunomiya H, Inagami T, Ichikawa I (1998)** Murine double nullizygotes of the angiotensin type 1A and 1B receptor genes duplicate severe abnormal phenotypes of angiotensinogen nullizygotes. *J Clin Invest* 101: 755–760

**Vander AJ (1967)** Control of renin release. *Physiol Rev* 47: 359-382

**Van Dongen R, Peart WS (1974)** Calcium dependence of the inhibitory effect of angiotensin on renin secretion in the isolated perfused kidney of the rat. *Br J Pharmacol* 50: 125–29

**Wagner C, de Wit C, Kurtz L, Grunberger C, Kurtz A, Schweda F (2007)** Connexin40 is essential for the pressure control of renin synthesis and secretion. *Circ Res* 100: 556–563

**Wagner C, Jobs A, Schweda F, Kurtz L, Kurt B, Lopez ML, Gomez RA, van Veen TA, de Wit C, Kurtz A (2010)** Selective deletion of Connexin 40 in renin-producing cells impairs renal baroreceptor function and is associated with arterial hypertension. *Kidney Int* 78: 762–768

**Wagner C, Kurtz A (1998)** Regulation of renal renin release. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 7: 437–441

**Wagner C, Kurtz A (2013)** Distribution and functional relevance of connexins in renin-producing cells. *Pflugers Arch* 465(1): 71-7

**Wagner C, Kurtz L, Schweda F, Simon AM, Kurtz A (2009)** Connexin 37 is dispensable for the control of the renin system and for positioning of renin-producing cells in the kidney. *Pflügers Arch* 459: 151–158

**Wagner C, Pfeifer A, Ruth P, Hofmann F, Kurtz A (1998)** Role of cGMP-kinase II in the control of renin secretion and renin expression. *J Clin Invest* 102: 1576-82

**Xu D, Borges GR, Grobe JL, et al. (2009)** Preservation of intracellular renin expression is insufficient to compensate for genetic loss of secreted renin. *Hypertension* 54:1240–1247

**Yao J, Suwa M, Li B, Kawamura K, Morioka T, Oite T (2003)** ATPdependent mechanism for coordination of intercellular Ca<sup>2+</sup> signaling and renin secretion in rat juxtaglomerular cells. *Circ Res* 93: 338–345

**Yukimura T, Miura K, Ito K, Yamamoto K (1986)** Renal vascular effects of dilazep antagonized by 3-isobutyl-1-methyl-xanthine. *J Cardiovasc Pharmacol* 8: 649–655

**Zhang J, Hill CE (2005)** Differential connexin expression in preglomerular and postglomerular vasculature: accentuation during diabetes. *Kidney Int* 68: 1171–1185

**Zusman RM (1980)** Prostaglandin E<sub>2</sub>-synthesis by renomedullary interstitial cells. In vitro studies and pathophysiological correlations. In: Mandal AK, Bohman SO (1980): The Renal Papilla and Hypertension. *Plenum Medical Book Company, New York, London* 187-202

## 7. Anhang

## 7.1 Abbildungsverzeichnis

**Abb. 1.1:** Schematische Darstellung des Renin-Angiotensin-Aldosteronsystems.

**Abb. 1.2:** Links: Schematische Darstellung eines Glomerulus. Rechts: Immunhistochemische Aufnahme eines Glomerulus (G) mit afferenter (aA) und efferenter Arteriole (eA) sowie distalem Tubulus (dT).

**Abb. 1.3:** Aktivierung des Mineralokortikoid-Rezeptors (MR) führt zu vermehrter Natrium- und Wasserrückresorption über das Sammelrohr-Epithel.

**Abb. 1.4:** Gap-Junctions im juxtaglomerulären Bereich.

**Abb. 2.1** Genotypisierungs-PCR für Aldosteronsynthese (AS, links) und Connexin 40 (Cx40, rechts).

**Abb. 3.1:** Immunfluoreszenzfärbung für Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot) im Nierenkortex von Wildtyp- und AS<sup>-/-</sup>-Mäusen.

**Abb. 3.2:** Konfokalmikroskopische Aufnahmen der afferenten Arteriole von Wildtyp (A-C; G) und AS<sup>-/-</sup>-Mäusen (D-F; H).

**Abb. 3.3:** Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Querschnitts durch eine afferente Arteriole einer AS<sup>-/-</sup> Maus.

**Abb. 3.4:** Altersabhängige Veränderungen der Anzahl Renin-produzierender Zellen in Wildtyp- und AS<sup>-/-</sup> Niere.

**Abb. 3.5:** Fläche Renin-positiver Zellen pro Glomerulus in Wildtyp- (A) und AS<sup>-/-</sup> Maus (B) zu verschiedenen Altersstadien (1-34 Wochen).

**Abb. 3.6:** Renale Renin-mRNA-Abundanz in Wildtyp- (A) und AS<sup>-/-</sup> Mäusen (B) zu verschiedenen Altersstadien (1-34 Wochen).

**Abb. 3.7:** Mitotische Zellen in perivaskulären Reninzellfeldern von AS<sup>-/-</sup> Mäusen zu verschiedenen Altersstadien (1-34 Wochen).

**Abb. 3.8:** Immunfluoreszenzfärbung für Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot) in AS<sup>-/-</sup> (A und B) und Wildtyp-Mäusen (C und D).

**Abb. 3.9:** Immunfluoreszenzfärbung für Renin (grün) und Sm22 (rot) in AS<sup>-/-</sup> (A und B) und Wildtyp-Mäusen (C und D).

**Abb. 3.10:** Immunfluoreszenzfärbung für Renin (grün) und PDGF-Rezeptor-β (rot) in AS<sup>-/-</sup> (A und B) und Wildtyp-Mäusen (C und D).

**Abb. 3.11:** Immunfluoreszenzfärbung für Renin (grün) und NG2 (rot) in AS<sup>-/-</sup> (A und B) und Wildtyp-Mäusen (C und D).

**Abb. 3.12:** Immunfluoreszenzfärbung für Renin (grün) und Kollagen I (rot) in AS<sup>-/-</sup> (A und B) und Wildtyp-Mäusen (C und D).

**Abb. 3.13:** Immunfluoreszenzfärbung für Renin (grün) und Prokollagen I (rot) in AS<sup>-/-</sup> (A und B) und Wildtyp-Mäusen (C und D).

**Abb. 3.14:** Immunfluoreszenzfärbung für Renin (grün) und Connexin 40 (rot) in AS<sup>-/-</sup> (A und B) und Wildtyp-Mäusen.

**Abb. 3.15:** Immunfluoreszenzfärbung für Renin (grün) und AKR1B7 (rot) in AS<sup>-/-</sup> (A und B) und Wildtyp-Mäusen (C und D).

**Abb. 3.16:** Plasma-Renin-Konzentration in Wildtyp- und AS<sup>-/-</sup> Maus.

**Abb. 3.17:** Auswirkung von Isoproterenol (A) und EGTA (B) auf die Renin-Sekretion in isoliert perfundierten Nieren von Wildtyp- und AS<sup>-/-</sup>-Mäusen.

**Abb. 3.18:** Auswirkung ansteigender Angiotensin II-Konzentrationen auf Renin-Sekretion (A) und Perfusatfluss (B) in isoliert perfundierten Nieren von Wildtyp- und AS<sup>-/-</sup>-Mäusen (bei konstantem Perfusionsdruck von 90 mmHg und in Gegenwart von 10 nmol/l Isoproterenol).

**Abb. 3.19:** Auswirkung des Perfusionsdrucks auf Renin-Sekretion (A) und Perfusatfluss (B) in isoliert perfundierten Nieren von Wildtyp- und AS<sup>-/-</sup>-Mäusen.

**Abb. 3.20:** Systolischer Blutdruck von Wildtyp- und AS<sup>-/-</sup>-Mäusen.

**Abb. 3.21:** Immunfluoreszenzfärbung des Glomerulus einer Cx40<sup>-/-</sup>-Maus. Dargestellt ist die Immunfluoreszenz für Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot).

**Abb. 3.22:** Immunfluoreszenzfärbung für Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot) im Nierenkortex von AS<sup>-/-</sup> und AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup>-Mäusen.

**Abb. 3.23:** Konfokalmikroskopische Aufnahmen der afferenten Arteriole von AS<sup>-/-</sup> - (A-C; G) und AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup>-Mäusen (D-F; H).

**Abb. 3.24:** Altersabhängige Veränderungen der Anzahl Renin-produzierender Zellen in AS<sup>-/-</sup> und AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup>-Niere.

**Abb. 3.25:** Fläche Renin-positiver Zellen pro Glomerulus in AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup> -Mäusen zu verschiedenen Altersstadien (1-34 Wochen).

**Abb. 3.26:** Altersabhängige Ausbreitung Renin-produzierender Zellen in den tubulointerstitiellen Raum in der AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup>-Niere.

**Abb. 3.27:** Altersabhängige Ausbreitung Renin-produzierender Zellen im Bereich der Bowman-Kapsel in der AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup>-Niere.

**Abb. 3.28:** Prozentualer Anteil von Glomeruli mit angrenzendem Reninzellfeld.

**Abb. 3.29:** Immunfluoreszenzfärbung für Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot) im Nierenkortex von AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup>-Mäusen im Alter von 16 und 34 Wochen.

**Abb. 3.30:** Renale Renin-mRNA-Abundanz in AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup>-Mäusen zu verschiedenen Altersstadien (1-34 Wochen).

**Abb. 3.31:** Immunfluoreszenzfärbung für Renin (grün) und Glattmuskelaktin (rot) in AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup> - Mäusen.

**Abb. 3.32:** Immunfluoreszenzfärbung für Renin (grün) und Sm22 (rot) in AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup>-Mäusen.

**Abb. 3.33:** Immunfluoreszenzfärbung für Renin (grün) und PDGF-Rezeptor-β (rot) in AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup>-Mäusen.



**Abb. 3.34:** Immunfluoreszenzfärbung für Renin (grün) und NG2 (rot) in AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup>-Mäusen.

**Abb. 3.35:** Immunfluoreszenzfärbung für Renin (grün) und Kollagen I (rot) in AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup>-Mäusen.

**Abb. 3.36:** Immunfluoreszenzfärbung für Renin (grün) und Prokollagen I (rot) in AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup>-Mäusen.

**Abb. 3.37:** Immunfluoreszenzfärbung für Renin (grün) und Connexin 40 (rot) in AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup>-Mäusen.

**Abb. 3.38:** Immunfluoreszenzfärbung Renin-positiver und Renin-negativer perivaskulärer Zellfelder in 34 Wochen alten AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup>-Mäusen.

**Abb. 3.39:** Plasma-Renin-Konzentration in AS<sup>-/-</sup> und AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup>-Maus.

**Abb. 3.40:** Auswirkung des Perfusionsdrucks auf die Renin-Sekretion in isoliert perfundierten Nieren von Cx40<sup>-/-</sup> und AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup>-Mäusen.

**Abb. 3.41:** Auswirkung von EGTA auf die Renin-Sekretion in isoliert perfundierten Nieren von Cx40<sup>-/-</sup> und AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup>-Mäusen.

**Abb. 3.42:** Systolischer Blutdruck von Wildtyp-, AS<sup>-/-</sup> und AS<sup>-/-</sup> Cx40<sup>-/-</sup>-Mäusen.

## 7.2 Tabellenverzeichnis

**Tab. 1:** Expression von Zellmarker-Proteinen in vaskulären und perivaskulären Reninzellen der AS<sup>-/-</sup>-Maus.

## 7.3 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACE	<i>angiotensin converting enzyme</i>
ACTH	Adrenocorticotropin
Ang I	Angiotensin I
Ang II	Angiotensin II
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
AS	Aldosteronsynthase
AT1	Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-1
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cAMP	<i>cyclic adenosine monophosphate</i>
cDNA	<i>copyDNA</i>
cGK II	cGMP-regulierte Proteinkinase II
cGMP	<i>cyclic guanosine monophosphate</i>
CGRP	<i>calcitonin gene related peptide</i>
COX-2	Cyclooxygenase 2
CRE	<i>cAMP response element</i>
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
Cx	Connexin
dd.	doppelt destilliert
d. h.	das heißt
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N',N'-tetraacetat
ENaC	<i>epithelial Na channel</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
frz.	französisch
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GTP	Guanosintriphosphat
gDNA	<i>genomic DNA</i>
HS	<i>horse serum</i>

IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
max.	maximal
MR	Mineralokortikoid-Rezeptor
mRNA	<i>messenger RNA</i>
PAF	<i>platelet activating factor</i>
PACAP	<i>pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDE-3	Phosphodiesterase 3
PDGFR- $\beta$	<i>platelet-derived growth factor receptor <math>\beta</math></i>
PGE2	Prostaglandin E2
PGI2	Prostaglandin I2
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RBP-J	<i>recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region</i>
RIA	Radioimmunoassay
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNase	Ribonuklease
ROMK	<i>renal outer medullary potassium (K) channel</i>
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SgK	Serum- und Glukokortikoid-induzierbare Kinase
SRE	<i>steroid response element</i>
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TNF $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$
TRIS	Tris-aminomethan
u. a.	unter anderem
upm	Umdrehungen pro Minute

Die Kenntnis chemischer Elementsymbole und Stoffverbindungen sowie von SI-Maßeinheiten und gängigen, in den Naturwissenschaften und in der Medizin gebrauchten Begriffsabkürzungen wurden vorausgesetzt.

### 7.3 Veröffentlichungen

Im Rahmen dieser Arbeit sind folgende Veröffentlichungen entstanden:

**Karger C, Kurtz F, Steppan D, Schwarzensteiner I, Machura K, Angel P, Banas B, Risteli J, Kurtz A (2013)** Procollagen I-expressing renin cell precursors. *Am J Physiol Renal Physiol* 305(3): F355-61

**Kurt B, Karger C, Wagner C, Kurtz A (2014)** Control of renin secretion from kidneys with renin cell hyperplasia. *Am J Physiol Renal Physiol* 306(3): F327-32

## 7.4 Danksagung

Diese Arbeit entstand durch die Mithilfe vieler Menschen, bei welchen ich mich an dieser Stelle gerne bedanken möchte:

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Armin Kurtz für die Bereitstellung des interessanten Themas und die wissenschaftliche Betreuung. Ich danke ihm sehr für das Vertrauen in meine selbstständige Arbeit und dafür, dass bei ihm jederzeit die Tür zum Büro offen stand.

Vielen herzlichen Dank auch an all diejenigen, mit denen ich im Lauf der letzten Jahre zusammenarbeiten und eine schöne Zeit verbringen durfte. Danke für die tolle Stimmung und Hilfsbereitschaft im Labor und im Büro.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Robert Götz und Anita Zügner für die Durchführung der Methode der isoliert perfundierten Niere bzw. der Transmissionselektronenmikroskopie.

Zuletzt danke ich meiner Familie, meinen Freunden und meiner Freundin dafür, dass sie während meiner Doktorarbeit immer für mich da waren und mich immer unterstützt haben.

## 7.5 Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

---